

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Alois Zdrha

Komparativní strukturní analýza povrchových virulentních faktorů *Borrelia* spp. se zaměřením na konzervovanost topologie jejich povrchu

Comparative structural analysis of *Borrelia* spp. virulent factors focusing on their surface topology conservation

Typ závěrečné práce:

Bakalářská práce

Vedoucí práce/Školitel:

RNDr. Karel Drbal, Ph.D.

Praha, 2020

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 8.6.2020

.....
Alois Zdrha

Poděkování

Děkuji svému školiteli RNDr. Karlu Drbalovi, Ph.D. za cenné rady, ochotu a trpělivost při vedení mé bakalářské práce. Dále bych chtěl poděkovat Mgr. Davidu Jakubcovi za pomoc s programem 3DPatch, Mgr. Vojtěchovi Zarskému za pomoc s programem HMMER a Bc. Michaelé Šímové, Mgr. Petře Hadlové a Mgr. Biance Porubské za pomoc se závěrečnou úpravou práce.

Seznam Zkratek

AA	amino acid	aminokyselina
ABC	ATP-binding cassette	ATP-vázající kazeta
BAM	β -barel assembly machinery	komplex tvořící β -barelové struktury
<i>Bbsl</i>	<i>Borrelia burgdorferi sensu lato</i>	<i>Borrelia burgdorferi sensu lato</i>
CDC	Centers for Disease Control and Prevention	Centra pro kontrolu a prevenci nemocí
cp	circular plasmid	cirkulární plasmid
CRASP	complement regulator-acquiring surface proteins	povrchové proteiny vázající regulátory komplementu
CSI	conserved signature indel	charakteristický konzervovaný indel
CSP	conserved signature protein	charakteristický konzervovaný protein
DR	direct repeats	přímé repetice
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control	Evropské centrum pro kontrolu a prevenci nemocí
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay	enzymová imunosorbentová esej
<i>erp</i>	OspE/F related proteins	OspE/F příbuzné proteiny
GAG	glycosaminoglycan	glykosaminoglykan
FH	factor H	faktor H
FHL	factor H-like	faktor H-podobné
FHR	factor H-related	factor H-příbuzné
IgG	immunoglobulin G	imunoglobulin G
IgM	immunoglobulin M	imunoglobulin M
IM	inner membrane	vnitřní membrána
IR	invariable region	nevariabilní oblast
LB	Lyme borreliosis	lymeská borrelióza
LBD	ligand binding domain	doména vázající ligand
Lol	lipoprotein localization	liporprotein lokalizující
lp	linear plamid	lineární plasmid
LPS	lipopolysaccharide	lipopolysacharid
LRS	long-read sequencing	sekvenování dlouhých úseků
MLSA	multiple locus sequence analysis	hromadná sekvenční analýza lokusů
MNH	multiple niche hypothesis	teorie různých ekologických nik
MSA	multiple sequence alignment	vícero vzájemně uspořádaných sekvencí
NCBI	National Center for Biotechnology Information	Národní centrum biotechnologických informací
NFDS	negative frequency-dependent selection	frekvenčně závislá negativní selekce
OM	outer membrane	vnější membrána
OMP	outer membrane protein	vnější membránový protein
PDB	Protein Data Bank	proteinová databáze
POCP	percentage of conserved proteins	procento konzervovaných proteinů
SLP	surface lipoprotein	povrchový lipoprotein
SRS	short-read sequencing	sekvenování krátkých úseků
Thd	T-helper dependent	závislá na pomocných T lymfocytech
Thi	T-helper independent	nezávislá na pomocných T lymfocytech
TROSPA	Tick receptor of OspA	klíšový receptor OspA
VR	variable region	variabilní oblast

Abstrakt

Gram-negativní bakterie rodu *Borrelia* jsou původcem dnes rozšiřujícího se onemocnění lymeské borreliózy. Jejich zařazení mezi gram-negativní bakterie je ale zavádějící, jelikož se od nich značně odlišují svým komplexním genomem, patogenními adaptacemi na hostitele a složením své povrchové membrány. Jeden druh borreliell může obsahovat vedle jednoho konzervovaného chromozomu až 23 variabilních plasmidů. I přesto borreliellám schází mnoho důležitých proteinů pro syntézu klíčových sloučenin, a proto musí tyto sloučeniny získávat od hostitele. Aby borreliella mohla využívat metabolické procesy hostitele ke své reprodukci, musí nejdříve hostitele infikovat a následně i přežít jeho imunitní obranu. K tomu jí slouží virulentní faktory, mezi které patří zejména značně variabilní povrchové lipoproteiny. Právě variabilita těchto lipoproteinů ztěžuje využití povrchových epitopů při detekci a následně i případné protilátkové terapii, protože většina dominantních antigenních epitopů borreliell se nachází ve variabilních částech zmíněných lipoproteinů.

K určení vhodných cílů pro protilátky dnes můžeme využít algoritmy, které stanoví evolučně konzervované epitopy na základě analýzy dostupných sekvencí daného lipoproteinu. Obecně jsou konzervované epitopy vhodné k terapeutickému zacílení a variabilní naopak k diagnostickému využití. Ve své práci hodnotím možnosti využití dvou vybraných programů pro strukturní analýzu evoluční konzervovanosti: ConSurf a 3DPatch. Z výsledků analýzy provedené na OspC a VlsE vyplývá, že ConSurf je přesnější v určování konzervovaných motivů, jelikož jeho výsledky mnohem lépe korespondují s publikovanými daty o variabilitě OspC a VlsE. Na druhou stranu se i přes horší výsledky může 3DPatch chlubit o několik řádů rychlejším algoritmem (vteřiny oproti hodinám).

Klíčová slova

Borrelia spp., epitop, genomová variabilita, povrchové virulentní faktory, komparativní strukturní analýza

Abstract

Gram-negative bacteria of genus *Borrelia* cause the nowadays spreading illness Lyme borreliosis. However, their classification as gram-negative bacteria is rather misleading because they differ in their complex genome, pathogenic adaptation to their hosts and composition of their outer membrane. One species of *Borrelia* can harbour up to 23 variable plasmids and one conserved chromosome and they still lack many crucial proteins needed for synthesis of key compounds. Hence, they have to obtain these compounds from the host. However, in order for *Borrelia* to utilise the metabolic processes of the host, it has to first survive its immune response. Therefore *Borrelia* contains many virulent factors including highly variable surface lipoproteins. The variability is a major obstacle to overcome when using their surface epitopes for detection and vaccine development because most of the dominant antigenic epitopes of *Borrelia* are usually parts of the most variable regions of the lipoproteins.

Nowadays, we can use many different algorithms which determine evolutionary conserved epitopes based on analysis of sequences of given lipoprotein, in order to find suitable targets for antibodies. In general, conserved epitopes are more suitable for vaccines, whereas more variable epitopes are better for diagnostics. In my thesis I compare two different programmes for structural analysis of evolutionary conservation: ConSurf and 3DPatch. The results of the analysis of OspC and VlsE indicate that ConSurf is superior in determination of conserved motives as its results are in agreement with published data about variability of OspC and VlsE. However, putting aside the worse results of 3DPatch, it has in contrast to ConSurf the advantage of being many folds faster (seconds vs hours).

Key words

Borrelia spp., epitope, genome variability, surface virulent factors, comparative structural analysis

Obsah

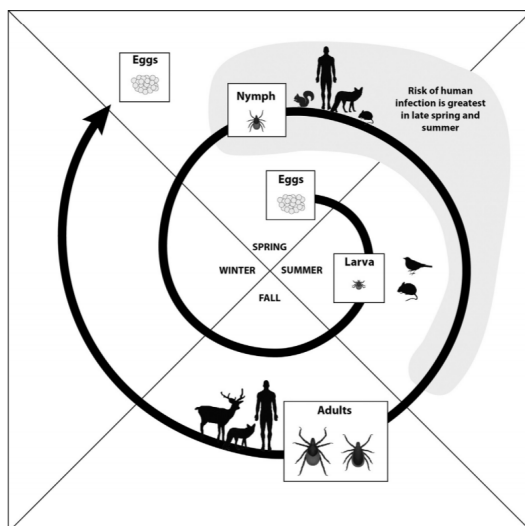
1	Úvod	1
1.1	Lymeská borrelióza	1
1.2	Borrelia	2
1.2.1	Virulentní faktory	3
1.3	Klinicky důležité povrchové virulentní faktory	3
1.4	Strukturní analýza proteinů	4
2	Rod Borrelia	5
2.1	Patogenní adaptace	6
2.2	Fylogeneze	6
3	Koevoluce plasmidů a SLP	7
3.1	Nedostatky při studiu plasmidů	8
3.2	Variabilita SLP genů	9
3.2.1	VlsE	10
3.2.2	OspC	11
3.2.3	Variabilita ostatních SLP	13
4	Funkční a antigenní domény SLP	14
4.1	Funkce SLP	15
4.1.1	Adheze ke střevům klíšťat	15
4.1.2	Únik imunitnímu systému	15
4.1.3	Diseminace a kolonizace	18
4.2	Topologie SLP	19
4.2.1	OspC	19
4.2.2	VlsE	21
4.2.3	OspE	22
4.2.4	OspA a OspB	23
4.2.5	DbpA	25
4.2.6	BBK32	26
4.2.7	BmpA	27
5	Komparativní analýza	28
5.1	Metodika	29
5.2	Výsledky	30
6	Závěr	33

1. Úvod

1.1 Lymeská borrelióza

Lymeská borrelióza („Lyme borreliosis“, LB) je nejčastější zoonóza přenášená klíšťaty rodu *Ixodes spp.* (nadále bude slovo klíště označovat rod *Ixodes spp.*) [101]. Byla identifikovaná roku 1975 ve městě Lyme ve státě Connecticut v USA. Původně byla spojována s *Babesia microti*, avšak tuto domněnku vyvrátil roku 1981 Wilhelm Burgdorfer, který při pozorování v temném poli objevil skutečného původce LB, gram-negativní spirochéty *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, izolovanou z *Ixodes scapularis* [11]. Od roku 1981 bylo popsáno přes 20 potenciálně patogenních druhů, které patří do *Borrelia burgdorferi sensu lato (Bbsl)* komplexu, z nichž hlavními původci LB jsou *B. burgdorferi s. s.* v Severní Americe a *B. afzelii* a *B. garinii* v Evropě [105].

Každý rok je v USA nahlášeno 30 000 případů LB [29], avšak nedávná studie ukazuje, že tento počet může ve skutečnosti být až desetkrát vyšší [56]. V USA je sledování případů LB možné, jelikož každý nahlášený případ projde přes státní organizaci, která podle jednotných kritérií rozhodne o pozitivitě a výsledky následně hlásí Centru pro kontrolu a prevenci nemocí („Centers for Disease Control and Prevention“, CDC) [29]. Oproti tomu většina evropských zemí má různá kritéria pro určování positivity LB [3] a i různé organizace, které výskyt LB sledují, jako např. český Státní zdravotní ústav (SZÚ). Dokonce ani Evropské centrum pro kontrolu a prevenci nemocí („European Centre for Disease Prevention and Control“, ECDC), zodpovědné za infekční choroby v Evropě, nemá žádná celistvá data o výskytu LB v Atlasu infekčních nemocí. Dohledatelná jsou jediné data o rozložení *Ixodes Ricinus* v Evropě. Z toho vyplývá, že je velmi složité dělat v Evropě podobné predikce o výskytu LB jako v USA. I přesto ale existuje mnoho důkazů, že v Evropě i v Americe dochází ke zvyšování incidence LB [106].



Obrázek č. 1: Dvouletý životní cyklus klíšťat. Siluety ukazují potenciální hostitele. Šedě vyznačená oblast znázorňuje dobu, kdy jsou klíšťata nejvíce aktivní, což koresponduje s největší šancí nákazy. [81]

LB se vyskytuje výhradně na severní polokouli, a to hlavně v mírném pásu. S výskytem LB samozřejmě koreluje i výskyt klíšťat, jelikož se jedná o hlavní vektory borrelielly. Každé klíště ale nemusí nutně borreliellu přenášet. Klíšťata totiž procházejí skrz životní cyklus larvy, nymfy a dospělce (viz Obr. č. 1), přičemž každé vývojové stádium se po jednom krmení vyvine do dalšího. Mezi každým krmením (a tudíž vývojovým stádiem) je vždy jeden rok. Celkově tedy vývoj klíštěte do stádia dospělce trvá 2 roky. Potenciálně infekčními stádii jsou ale pouze nymfy a dospělci, jelikož čerstvě vylíhnuté larvy nejsou infikované, i když samice byla, neboť k přenosu borrelielly ze samice na potomky nedochází [81].

1.2 Borreliella

Původcem LB jsou gram-negativní spirochéty z *Bbsl* komplexu. To znamená, že se jedná o podlouhlé spirálovité bakterie s vnější membránou („outer membrane“, OM), periplasmatickým prostorem a vnitřní membránou („inner membrane“, IM). V periplasmě se nachází bičík zodpovědný za tvar a pohyb bakterie. Tyto znaky, sdílené s gram-negativními bakteriemi, jsou ale u borrelielly upozaděny jejími odlišnostmi: genetickou výbavou a složením OM [103].

Oproti běžným gram-negativním bakteriím má borreliella velmi fragmentovaný genom. Jedna borreliella obsahuje vždy 1 značně konzervovaný lineární chromozom a až 23 variabilních plasmidů. Od ostatních bakterií ji také odlišuje značné množství nekódujících sekvencí a pseudogenů [27]. Navíc z genomového obsahu jasně vyplývá, že borreliella je dokonale přizpůsobená parazitickému způsobu života. Neobsahuje totiž žádné geny nutné pro oxidativní fosforylaci, syntézu aminokyselin („amino acid“, AA), nukleonových kyselin ani kofaktorů. Namísto toho ale obsahuje několik desítek genů pro víceúčelové přenašeče, které tyto nedostatky kompenzují. Borreliella dokonce není schopná ani syntézy lipidů. V důsledku této neschopnosti odpovídá složení lipidů borrelielly hostiteli, ve kterém se zrovna nachází [105].

Patogenní adaptace a fragmentovaný genom ale nejsou jedinými zvláštnostmi borreliell. Zejména OM se totiž vymyká klasickému schématu gram-negativních bakterií, jelikož obsahuje dvě významné majoritní složky: vnější membránové proteiny („outer membrane protein“, OMP) a povrchové lipoproteiny („surface lipoprotein“, SLP). OMP jsou proteiny, které překonávají OM většinou jako β -barelové struktury, zatímco SLP jsou proteiny, které jsou k OM přichycené fosfolipidovou kotvou. Oproti tomu klasické gram-negativní bakterie mají jako majoritní složku OM lipopolysacharidy („lipopolysaccharide“, LPS), což jsou oligosacharidové řetězce připojené k OM pomocí fosfolipidů [123].

Jak OMP, tak SLP musí překonávat IM a musí být následně integrovaný do OM. K překonání IM slouží hlavně Sec proteiny, skrz které se proteiny dostávají buď ko-

translačně, a nebo post-translačně pomocí chaperonů. Po překonání IM se již integrace OMP a SLP liší. OMP jsou do membrány zabudovány pomocí komplexu tvořícího β -barelové struktury („ β -barel assembly machinery“, BAM), zatímco SLP se do OM dostávají pomocí lipoprotein lokalizujících („lipoprotein localization“, Lol) proteinů [123].

1.2.1 Virulentní faktory

Když *Borrelia* infikuje nového hostitele, může jako jakákoliv jiná bakterie způsobovat patologické stavy. Tyto stavy jsou způsobeny buď pouhou přítomností specifických struktur a molekul, které bakterie obsahuje, a nebo látkami, které bakterie cíleně vylučuje. V obou případech mluvíme o tzv. virulentních faktorech, jejichž hlavní funkcí je udržet bakterii v hostiteli, aby mohla proliferovat a dále se šířit [70]. Vzhledem k tomu, že právě takové funkce mají OMP i SLP, dají se tyto povrchové proteiny v rámci *Borrelia* považovat za virulentní faktory. [64].

Tyto faktory můžeme rozdělit do několika kategorií podle jejich hlavních funkcí v životním cyklu *Borrelia*, který začíná ve střevě klíštěte. Přichycení ke střevům klíštěte zajišťují zejména dva SLP, a to OspA a OspB [64]. Když se klíště začne krmit na potenciálním hostiteli, dojde k výrazné změně vnitřního prostředí střev. Zvýší se teplota, množství kyslíku, kyslíkových radikálů a živin, zatímco pH klesne. To vše způsobí snížení exprese OspA a OspB a naopak zapříčiní zvýšení exprese dalších virulentních faktorů. [105]. *Borrelia* po těchto změnách několik hodin proliferuje a poté neznámým mechanismem cestuje do slinných žláz, kudy infikuje nového hostitele [103]. Jako první po infekci jsou zapotřebí všechny proteiny, které chrání *Borrelia* před imunitní reakcí hostitele. Sem patří SLP OspC, OspE, VlsE a BBK32 [74]. Nakonec *Borrelia* potřebuje uniknout z prvotního místa infekce a kolonizovat tkáň hostitele. To jí opět umožňují OspC a BBK32, ale i další SLP jako DbpA, DbpB a BmpA, jakožto i některé OMP jako P66 a Lmp1 [64].

1.3 Klinicky důležité povrchové virulentní faktory

V klinické praxi je pro určení nákazy nejlepší přímá detekce patogenu. Takové detekce jsou ale velmi často složité, ne-li úplně nemožné. *Borrelia* v tom není výjimkou. Přímá detekce pomocí kultivace nebo polymerázových řetězových reakcí je náročná, nestandardizovaná a není doporučena pro klinickou praxi [75]. Oproti tomu nepřímá sérologická detekce se v praxi hojně využívá. Nejčastěji používaným testem k potvrzení diagnózy LB je dvoustupňový test zahrnující vysoce senzitivní enzymovou imunisorbentovou esej („Enzyme linked immunosorbent assay“, ELISA), která je v případě positivity následovaná specifickým imunoblotem [103, 105].

Mezi přímou a nepřímou detekcí jsou velké rozdíly v senzitivitě, specificitě a možnosti optimalizace. Společné ale mají cíle, jimiž jsou především antigenní proteiny borrelielly. Mezi ty patří všechny dříve zmíněné virulentní faktory, jakožto i některé další, jako např. flagelinový protein Fla [75].

Další důležité odvětví, které využívá virulentní faktory borrelielly, je výzkum vakcín. První vakcína byla schválena k použití již v devadesátých letech, a to proti OspA. Ta měla zamezit samotnému přenosu borrelielly z klíštěte na člověka. Výsledky byly ale sporné, a proto byla vakcína už v roce 2002 stažena z trhu. Testy nových vakcín ale stále probíhají, a to zejména na OspA a OspC [49]. Je očividné, že množství virulentních faktorů borrelielly, stejně jako jejich využití, je nepřehledné, z toho důvodu se zaměřím pouze na ty, které mají největší význam pro klinickou praxi (viz Tab. č. 1).

Zkratka	Název	Lokace	Využití
BBK32	Fibronectin binding protein	lp36	diagnóza
BmpA	Basic membrane protein A	chromozom	diagnóza
DbpA	Decorin binding protein A	lp54	diagnóza
OspA	Outer surface protein A	lp54	diagnóza/vakcína
OspB	Outer surface protein B	lp54	diagnóza
OspC	Outer surface protein C	cp26	diagnóza/vakcína
OspE	Outer surface protein E	cp32	diagnóza
VlsE	Variable major protein-like sequence	lp28-1	diagnóza

Tabulka č. 1: Vybrané diagnosticky a terapeuticky důležité povrchové virulentní faktory *Bbsl* komplexu. Zkratka lp značí lineární plasmidy, zatímco cp značí cirkulární plasmidy. Zkratky jsou propojené s odpovídajícími proteiny v proteinové databázi („Protein databank“, PDB), pokud je alespoň část struktury známá. [49, 75, 64]

1.4 Strukturní analýza proteinů

Strukturní biologie je obor, který zažívá neuvěřitelný rozmach. Techniky jako nukleární magnetická rezonance, kryo-elektronová mikroskopie a krystalografie nám umožňují pochopit dynamické struktury proteinů a jejich interakce jako nikdy dříve. Se zvyšujícím se množstvím strukturních dat ale do popředí přicházejí i počítačové programy schopné předpovídat struktury a interakce na základě experimentálních dat a sekvencí daných proteinů. U těchto programů hraje hlavní roli sekvenční podobnost proteinů neboli sekvenční homologie. Na jejím základě se mohou odvozovat struktury proteinů a jejich interakce, které nebyly experimentálně potvrzené [38].

Homologie mezi sekvencemi ale nemusí být využita pouze k predikci struktur a interakcí. Vzhledem k množství veřejně dostupných dat můžeme vyselektovat pouze varianty jednoho proteinu a na základě porovnávání těchto variant pak můžeme určit konzervované a variabilní úseky daného proteinu. Takto získané údaje vypovídají o evolučně konzervovaných doménách, které jsou funkčně nepostradatelné a mohly by být i terapeuticky či diagnosticky důležité. Takovouto analýzou evoluční konzervovanosti se zabývá několik volně dostupných programů. V této práci byly využity starší a hojně používané

ConSurf [8] a nový 3DPatch [62], jelikož se kromě rozdílného data vydání liší i ve způsobu výpočtu skóre konzervovanosti.

Hlavním cílem práce je zmapovat naše znalosti o diagnosticky a terapeuticky důležitých povrchových virulentních faktorech *Bbsl* komplexu. Speciální důraz je kladen na rozdělení jejich povrchu na funkční a antigenní domény a zjištění variability nebo konzervovanosti těchto povrchových domén mezi stejnými a různými druhy *Bbsl* komplexu. Na základě těchto znalostí o vybraných virulentních faktorech a své vlastní analýzy zhodnotím možnosti využití obou programů a zároveň zjistím, který výpočetní algoritmus je vhodnější pro stanovení evoluční konzervovanosti.

2. Rod *Borrelia*

Rod *Borrelia* byl až do roku 2014 neformálně rozdělen do dvou skupin. První skupinu tvořily borrelie způsobující Lymeskou borreliózu, tzv. *Bbsl* komplex, a druhou skupinu tvořily borrelie způsobující návratovou horečku. Toto rozdělení bylo ale založené pouze na klinických projevech těchto bakterií a scházelo mu genetické opodstatnění. To se změnilo roku 2014, kdy bylo navrženo rozdělení rodu na dva: rod *Borrelia*, obsahující borrelie způsobující návratovou horečku, a rod *Borrelia*, obsahující *Bbsl* komplex. Rozdělení bylo založeno především na identifikaci rodově charakteristických konzervovaných indelů („conserved signature indel“, CSI) a proteinů („conserved signature protein“, CSP) [1]. Tato změna zůstala vcelku dlouho bez povšimnutí a její kritika vyšla teprve nedávno [79].

Hlavním kritizovaným bodem bylo právě využití CSI a CSP. Přesněji, jejich selekce měla být zaujatá a nepředstavovala skutečnou biologickou podstatu rodu *Borrelia*. Autoři této kritiky částečně zopakovali analýzu a přidali k ní dvě nově charakterizované borrelie, které se ale fylogeneticky liší od obou rodů. Dále pak ukázali, že měření procenta konzervovanosti všech proteinů („percentage of conserved proteins“, POCP) v genomu, s tím že 50% hranice konzervovanosti určuje rozdílné druhy, nepodporuje rozdělení původního rodu *Borrelia* [79].

V odpovědi na tuto kritiku autoři původního článku vydali další studii. V ní demonstrují nedostatečnost 50% hranice u POCP a také tvrdí, že nedostatečné rozlišení borrelií návratové horečky touto metodou je způsobeno zahrnutím variabilních plasmidů do analýzy, a argumentují tím, že v běžné praxi se využívají stabilnější úseky genomů, tedy především chromozómy. Na základě těchto argumentů poté prezentovali, že i pomocí POCP lze potvrdit rozdělení původního rodu. Dále pak opět provedli analýzu s využitím CSI a CSP i se dvěma výše zmíněnými novými druhy borrelií a ukázali, že i přes jejich zahrnutí jsou stále schopni velmi dobře rozlišit dva nově navržené rody [51].

Změny v taxonomii rodu se ale nikterak nereflktují ve způsobu, jak se k těmto rodům přisuzují nové druhy. Nejnovější přírůstek k *Bbsl* komplexu, a tedy k rodu *Borrelia*, byla *B. mayonii*. Její příslušnost k tomuto rodu byla potvrzena stejně jako v předchozích případech nově identifikovaných borreliell ověřenou metodou hromadné sekvenční analýzy lokusů („multiple locus sequence analysis“, MLSA) osmi esenciálních genů, které se nacházejí na chromozomu [94].

2.1 Patogenní adaptace

Každý patogenní organismus se musí adaptovat na své hostitele. Jak bylo řečeno, borreliella není schopná syntézy mnoha důležitých buněčných komponentů. Z klinického hlediska je nejzajímavější neschopnost syntézy lipidových molekul. Z nich jsou nejdůležitější zejména cholesterol a jejich deriváty. Ty hrají totiž důležitou roli v udržování lipidových raftů, které jak v IM, tak v OM asociují pro borreliell nepostradatelné proteiny. V lipidových raftech IM to jsou především transportní, metabolické a signální proteiny, zatímco v OM jde zejména o vnější virulentní faktory jako OspA, OspB a P66 [110].

Asociace proteinů v lipidových raftech velmi často zajišťuje jejich funkčnost, a jelikož borreliella není schopná cholesterol pro rafty syntetizovat, musí ho získávat od svého hostitele. Tato akvizice cholesterolu se děje především pomocí fyzického kontaktu s buňkou hostitele, při kterém si borreliella neznámým mechanismem přivlastňuje cholesterol hostitele. Výměna je ale oboustranná a i buňky hostitele získají některé lipidové molekuly borrelielly [34]. Mezi molekulami, které získávají buňky hostitele, je i cholesteryl 6-O-acyl- β -D-galaktopyranosid, což je významný antigen borreliell, specifický pro pozdní stádia LB [107].

Přenos lipidů ale nemusí být zprostředkovaný pouze fyzickým kontaktem. Borreliella je totiž schopná vytvářet z OM vesikuly, které jsou alespoň v *in vitro* podmínkách schopné fúzovat s lidskými HeLa buňkami. Tímto způsobem se do membrány hostitele mohou dostat jak antigenní cholesterolové deriváty, tak i některé proteinové virulentní faktory. Tyto borreliellové antigeny v hostitelských buňkách by teoreticky mohly být důvodem patogenity borreliell [34].

2.2 Fylogeneze

Jedna borreliella může obsahovat kromě jednoho konzervovaného chromozomu až 23 variabilních plasmidů. Ovšem i když dva izoláty obsahují podobný počet plasmidů, neznamená to, že se jedná o stejné druhy plasmidů. Celkově totiž zatím bylo identifikováno 32 různých plasmidů, a to na základě homologie genů z proteinové rodiny 32, 49, 50 a 57/62 [27], jelikož se jedná o geny, které jsou nezbytné pro kompatibilitu plasmidů [108]. I tyto druhy plasmidů mají ale zároveň své poddruhy, které vyplývají z variací

v genomovém uspořádání. Tyto genomové variace nejspíše vznikají díky různým přestavbám s jinými plasmidy, jelikož mnoho částí různých plasmidů odpovídá jiným částem z jiných plasmidů, např. levá extenze lp17, dlouhá přibližně 5 kb *B. burgdorferi* N40, odpovídá z 98% části lp36. [27].

Z fylogenetického hlediska je ale zajímavé, že tyto druhy a subdruhy nejsou v borreliellách náhodně uspořádány, nýbrž korespondují s jednotlivými druhy borreliell. Přesněji tedy korespondují s určitými typy chromozómů. Ze všech těchto vlastností plasmidů vyplývá, že různé druhy borreliell se nevyvíjejí z jednoho společného předka, nýbrž že vždy po oddělení druhu dochází k vývoji jedné větve samostatně. To koresponduje s výsledky fylogeneze rodu borreliell a fylogeneze plasmidů, jelikož např. *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. spielmanii* a *B. valaisiana* mají všechny shodnou inverzi v lp17 a podle druhové fylogeneze mají tyto 4 druhy jednoho předka [28]. Interaktivní fylogenetické stromy druhů i plasmidů jsou dostupné na [borreliabase](#).

3. Koevoluce plasmidů a SLP

Jak bylo řečeno, plasmidy borreliell se v některých ohledech značně liší, ale zato mají i mezi sebou dlouhé homologní oblasti. Navíc obsahují většinu genů SLP, které jsou pro borreliellu nepostradatelné při infekci hostitele [64]. Otázkou tedy je, jak a jestli vůbec evoluce plasmidů ovlivňuje SLP.

Vzhledem k množství pseudogenů a nekódujících sekvencí v plasmidech borreliell můžeme říct, že mechanismem vývoje plasmidů jsou změny typu duplikace, inverze a různé rekombinace [27]. V některých případech může být množství nekódující DNA dokonce větší než 50 %, což je v bakteriální říši vzácné [28].

Z výše zmíněných chromozomálních přestaveb jsou u borreliell pravděpodobně nejčastější rekombinace. Ty se mohou dít v rámci jedné borrelielly, jelikož jedna buňka může obsahovat až 23 různých plasmidů [27]. Ovšem u bakterií může docházet i k rekombinaci mezi různými plasmidy od různých bakterií pomocí horizontálního přenosu genetické informace. Aby ale k tomuto přenosu mohlo docházet, musí být splněny dvě podmínky. Zaprvé bakterie musí sdílet ekologické niky a zadruhé plasmidy musí být schopné horizontálního přenosu. První podmínka společných nik je v případě borreliell splněna, jelikož bylo mnohokrát dokázáno, že např. různé *ospC* genotypy sdílejí jak klíčící, tak savčí hostitele [96]. Ani druhá podmínka není u borreliell problematická. Skutečně u některých plasmidů, jako např. u lp56, se schopnost horizontálního přenosu předpokládá a u cp32 byla dokonce *in vitro* potvrzena [28].

Je tedy možné, že rekombinace hraje důležitou roli při vývoji plasmidů. S vývojem plasmidů je ale také bezprostředně spjat vývoj SLP. Lze tedy předpokládat, že i vývoj SLP

může být do značné míry ovlivněn rekombinací. Význam rekombinace pro některé SLP byl prokázán na nepostradatelných částech genomu *borreliell*: lp54, cp36 a chromozomu. Rekombinace v nich byla 3x častější než mutace. Dále bylo zjištěno, že rekombinace se v nich vyskytuje v četnějších frekvencích u určitých SLP, jako např. *ospC* (cp26), *dbpA* (lp54) a *lmp1* (chromozom) [55].

Uvedené údaje se ovšem týkají pouze rekombinace uvnitř plasmidu jedné bakterie a nezohledňují možnost rekombinace mezi různými druhy. Právě lp54 ani cp26 ale pravděpodobně nejsou schopny horizontálního přenosu. Důkazem této neschopnosti jsou fylogenetické stromy sestavené na základě dvou uvedených plasmidů a chromozomu. Porovnáme-li tyto fylogenetické stromy, zjistíme, že jsou téměř identické [83]. To naznačuje, že k přenosu těchto celých plasmidů skutečně nedochází. I přesto ale pozorujeme značnou variabilitu na jejich SLP.

Je tedy možné, že pro variabilitu některých plasmidů je důležitá jak rekombinace mezi plasmidy jedné *borrelielly*, tak rekombinace mezi plasmidy z jiných *borreliell*. Oproti tomu pro variabilitu SLP je důležitější rekombinace uvnitř plasmidu, jelikož pozorujeme vysokou variabilitu i u plasmidů, které s velkou pravděpodobností nejsou schopny horizontálního přenosu.

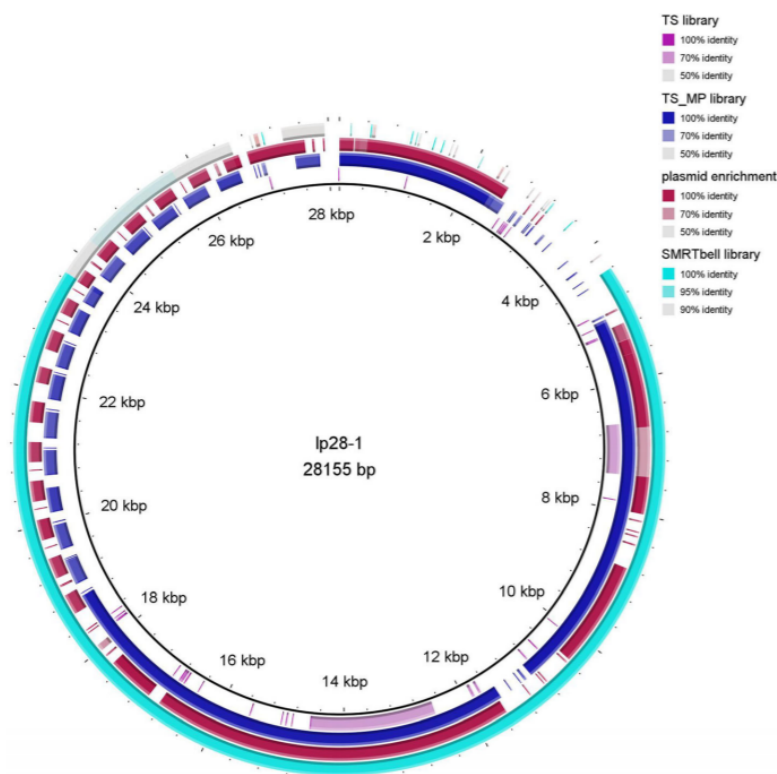
Z novějších studií na plasmidech ale vyplývá, že frekvence rekombinací mezi jednotlivými druhy *borreliell* je výrazně menší než frekvence bodových mutací [27]. Důležitost rekombinace mezi druhy dále vyvrací, že i když *borreliella* obsahuje tak značné množství dosti odlišných plasmidů, je jejich mozaicita nízká a genový repertoár relativně stabilní [93]. Lze tedy předpokládat, že rekombinace mezi druhy pravděpodobně příliš neovlivňuje ani variabilitu plasmidů. Celkově se tedy zdá, že i když rekombinace mezi druhy může přinášet určité změny plasmidům (zejména u cp32), hlavním zdrojem variability jak SLP, tak plasmidů je rekombinace mezi plasmidy jedné *borrelielly*.

3.1 Nedostatky při studiu plasmidů

Činit jakékoliv závěry o propojení variability plasmidů a SLP může být ale zavádějící, jelikož mnoho našich poznatků o plasmidech může být značně zkreslených. Toto zkreslení vyplývá ze dvou důvodů. Zaprvé jsme pravděpodobně ještě nenalezli všechny druhy plasmidů, které může *borreliella* obsahovat, protože během dlouhé *in vitro* kultivace, která je potřebná pro většinu studií, se ztrácí více jak 1/3 plasmidů [20].

Zadruhé mnoho našich znalostí o plasmidech *borrelielly* pochází ze sekvenování krátkých sekvencí („short-read sequencing“, SRS). Tento způsob sekvenování využívá paralelní čtení mnoha úseků DNA o velikosti stovek bází. Sekvence potom musí být zpětně poskládány do původní formy, k čemuž je většinou zapotřebí referenční genom. SRS je relativně spolehlivé za dvou podmínek: jsou-li plasmidy málo sekvenčně podobné a je-li velikost plasmidu do 50 kb, přičemž okolo této hraniční hodnoty velikosti má se sekvenací

problém většina SRS. Přesáhne-li velikost plasmidu 50 kb a nebo obsahují-li plasmidy mnoho podobných sekvencí, jsou SRS zatíženy značnou chybou [7]. A právě plasmidy *borreliell* obsahují značně homologní úseky a navíc několik plasmidů o velikosti okolo 50 kb jako například lp32-6, lp32-12, lp28-3 a lp36 [28].



Obrázek č. 2: *De novo* složení plasmidu lp28-1 izolátu B31-NRZ. Knihovny TS, MP a obohacená plasmidová DNA byly získány pomocí SRS. SMRTbell knihovna byla složena za pomoci LRS. Na obrázku lze pozorovat zlepšení při skládání *de novo* u kombinace TS a MP, stejně jako u obohacení plasmidové DNA, na rozdíl od použití samotné TS knihovny. SMRTbell knihovna ovšem dosahuje nejlepšího výsledku při skládání, i když ještě lepšího výsledku by bylo dosaženo při kombinaci knihoven SMRTbell a obohacení plasmidové DNA. [78]

Nahradit *in vitro* kultivace jinými metodami je prozatím mimo naše technologické možnosti, ale nedostatky SRS můžeme kompenzovat pomocí sekvenování dlouhých úseků („long-read sequencing“, LRS). LRS narozdíl od SRS nevyžaduje fragmentaci genomu na menší úseky, které je poté nutné skládat, jelikož může přecházet bez větších problémů úseky o délce několika desítek kb. Ovšem ani LRS není bezchybné, jelikož může způsobovat náhodné inserce či delece, a tudíž v některých případech může být dosaženo nejlepšího výsledku pouze při kombinaci SRS a LRS (viz Obr. č. 2). Zejména vysoce homologní plasmidy cp32-n ($n = 1$ a 3-13) vyžadují sekvenování pomocí LRS i SRS dohromady, aby byl dosažen nejpřesnější výsledek [78].

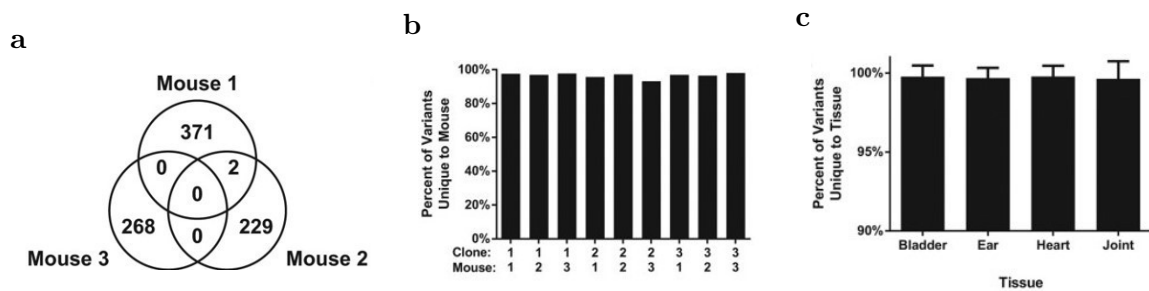
3.2 Variabilita SLP genů

Součástí většiny plasmidů jsou ORF povrchových virulentních faktorů, přičemž v případě *borreliell* se jedná hlavně o SLP. Dnes se převážně zkoumá přibližně 50 známých

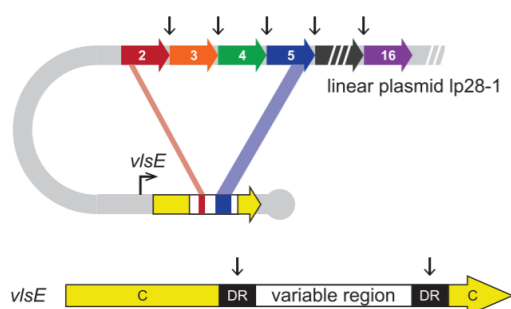
SLP, přestože genom *borreliell* obsahuje přes 120 SLP, z nichž 2/3 se vyskytují na povrchu [39]. To znamená, že stále nemáme žádné informace o téměř polovině SLP, které by mohly být důležité pro infektivitu *borreliell*. Kromě počtu SLP je důležitá i jejich variabilita, jelikož různé varianty mají různé afinity k cílovým proteinům hostitele a je tedy zřejmé, že ovlivňují infektivitu daného druhu [113].

3.2.1 VlsE

Gen *vlsE* je nejvíce variabilní úsek genomu *borreliell*, protože *borreliella* vytváří mnoho různých variant tohoto genu během infekce savčího hostitele. Potenciál, jaký *vlsE* pro tvoření různých variant má, je ohromný. Bylo experimentálně prokázáno, že rozdílné varianty *vlsE* genu izolované z různých potkanů jsou téměř naprosto unikátní (viz Obr. č. 3a a č. 3b). Stejnou unikátnost můžeme vidět, podíváme-li se na izoláty *B. burgdorferi* B31 z různých částí jedné myši (viz Obr. č. 3c). Jedinečnost variant *vlsE* v různých orgánech jedné myši naznačuje, že *borreliella* po infekci migruje do rozličných orgánů, ale po usazení už dále nemigruje a pouze se na daném místě lokálně množí [114].



Obrázek č. 3: Unikátnost variant *vlsE* genu. a a b: Ukazují variabilitu *vlsE* mezi různými potkany. **c:** Vyobrazuje unikátnost *vlsE* variant v jednom potkanovi. [114]



Obrázek č. 4: Struktura genu *vlsE* a *vls* kazet na lp28-1. Šipky ukazují pozici DR. Barevné čáry naznačují možný způsob rekombinace s *vls* kazetami. [116]

Z výzkumů na izolátu B31 víme, že *vlsE* gen se skládá z variabilního úseku, který je obklopen přímými repetitivy („direct repeats“, DR). DR jsou dále ohraničeny přiléhajícími konzervovanými úseky genu *vlsE*. Nové varianty jsou pravděpodobně vytvářeny homologní rekombinací variabilního úseku s *vls* kazetami (viz Obr. č. 4) [116]. Pro homologní rekombinaci je za normálních okolností potřeba protein RecA, jehož homolog se nachází i v genomu *borreliell*. Bylo dokázáno, že mutant v tomto genu má sníženou schopnost

infekce. Ta ale není způsobená narušenou rekombinací *vlse* genu. Rekombinace *vlse* genu je tedy na RecA nezávislá [73]. Dodnes byly identifikovány pouze dva proteiny, a to RuvA a B, které jsou nepostradatelné pro *vlse* rekombinaci. Tyto proteiny jsou schopné manipulovat s Hollidayovou strukturou, ale nejsou schopné ji rozštěpit. Tuto funkci normálně zastává RuvC, jehož homolog ale v genomu *borreliell* chybí [40].

Očividně máme v našich znalostech značné nedostatky o tom, jak rekombinace u *borreliell* přesně probíhá. I přesto ale známe některé vlastnosti rekombinace *vlse*. Bylo například ukázáno, že některé kazety jsou preferovanější než jiné a že DR a krajní homologní úseky mezi kazetami a variabilním úsekem *vlse* mají důležitou roli při crossing-overu [116]. Ovšem je nutné podotknout, že *vlse* geny jsou různé dokonce už mezi různými izoláty jednoho druhu, jak dokazuje studie provedená na *B. burgdorferi* JD1. Gen *vlse* JD1 neobsahuje DR a jeho kazety se navzájem překrývají. JD1 je zároveň méně virulentní než B31 [115]. Absence DR v izolátu JD1 ukazuje, že možná nejsou tak důležité při tvorbě nových variant, jak vyplývá z experimentů provedených na B31. Abychom tedy plně porozuměli, jakým způsobem funguje rekombinace *vlse* genu, je zapotřebí jeho další výzkum, zejména u různých druhů *borreliell*.

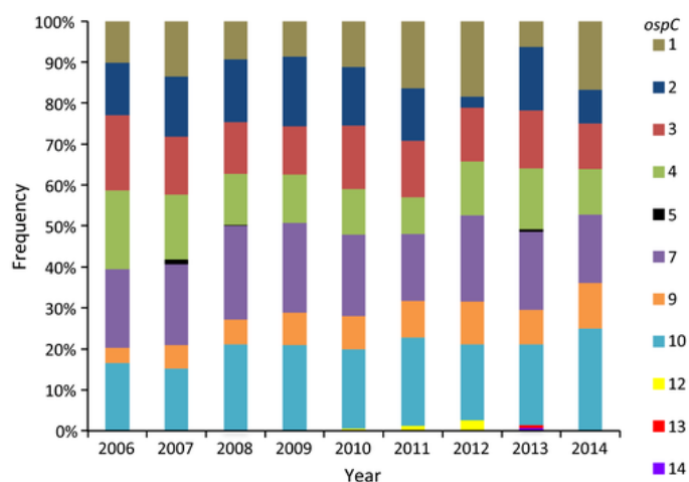
3.2.2 *OspC*

Gen *ospC* je druhý nejvariabilnější úsek genomu *borreliell* s několika desítkami různých alel. U *ospC* genu je patrná určitá mozaicita, která koreluje s možnou rekombinací mezi různými *ospC* genotypy. Rekombinace mezi různými *ospC* genotypy je možná, protože jedno klíště může být naráz infikováno několika různými *ospC* genotypy [10]. Jak ale bylo řečeno výše, rekombinace uvnitř cp26 je pravděpodobně důležitější pro vývoj *Osp* než rekombinace s jinými cp26. Navíc cp26 pravděpodobně není schopen horizontálního přenosu [28], což dále podporuje důležitost rekombinace uvnitř cp26.

Je zajímavé, že *ospC* genotypy nejsou po světě rovnoměrně rozložené. Každá geografická oblast obsahuje různé typy *ospC* genotypů, které se navíc v dané oblasti v průběhu času nemění (viz Obr. č. 5) [96]. S touto udržující se genetickou variabilitou souvisí dva problémy, které jsme prozatím nebyli schopni vyřešit: jakým způsobem se *ospC* genotypy udržují v přírodě a jaký vztah mají mezi sebou různé *ospC* genotypy, sejdou-li se v jednom hostiteli.

Existují dvě hlavní teorie, které se snaží vysvětlit značný polymorfismus *ospC* genu: teorie různých ekologických nik („multiple niche hypothesis“, MNH) a frekvenčně závislá negativní selekce („negative frequency-dependent selection“, NFDS). NFDS je druh stabilizující selekce, který udržuje v přírodě rozličné *ospC* genotypy, jelikož méně rozšířené *ospC* genotypy mají větší šanci infikovat hostitele než časté *ospC* genotypy. Důvodem větší šance na infekci je, že méně časté *ospC* genotypy mají menší šanci narazit na hostitele, který byl infikován stejným *ospC* genotypem, a hostitel tedy proti nim nemá

žádné protilátky, které by mu umožnily rychlou eliminaci infekce [22]. Z toho vyplývá, že téměř žádná druhá infekce *borreliell* nebude způsobena stejným *ospC* genotypem, což bylo úspěšně demonstrováno na pacientech LB v USA [85].



Obrázek č. 5: Rozložení *ospC* genotypů v průběhu roku v savčích hostitelích. Na grafu lze pozorovat stabilitu *ospC* genotypů v jižním Švédsku. [96]

NFDS ale nevysvětluje případy, kdy specifické *ospC* genotypy infikují preferenčně určité hostitele. Tyto příklady se ovšem často vyskytují jak u lidských [23], tak u zvířecích hostitelů [82]. Zmíněnou preferenci určitého hostitele potvrzuje spíše MNH. MNH je také druh stabilizující selekce stejně jako NFDS. Na rozdíl od NFDS ale vysvětluje udržování různých *ospC* genotypů na základě selekční výhody konkrétních *ospC* genotypů v určitých hostitelích [22]. Jiné studie ale MNH zpochybňují a naznačují, že při udržování *ospC* genotypů se uplatňují ještě jiné mechanismy [104].

Dalším stále nevyřešeným problémem jsou vzájemné vztahy *borreliell* při koinfekci jednoho hostitele. Tyto vztahy dále určují rozložení *ospC* genotypů a jedná se buď o kooperaci, a nebo o kompetici. V případě kooperace se dá očekávat, že infekce jedním *ospC* genotypem není při porovnání s infekcí více *ospC* genotypy dominantní. Tento předpoklad potvrzuje studie, ve které byli po dobu 2 let v přirozeném prostředí pravidelně odchytáváni hraboši, ze kterých byly získávány vzorky. Výsledky jasně ukázaly agregaci určitých *ospC* genotypů, což potvrzuje kooperaci mezi *ospC* genotypy [4].

Na druhou stranu další studie prokázala, že mezi *ospC* genotypy dochází ke kompetici. Při studii byly využity pouze dva *ospC* genotypy na jednom hostiteli, ale i tak bylo prokazatelné, že při společné infekci v hostiteli jeden z genotypů částečně převládá [48]. Tato a jedna další studie, také provedená na dvou *ospC* genotypech a jednom hostiteli, dále ukazují, že vzájemná kompetice je navíc závislá na mnoha faktorech, které určují, do jaké míry bude kompetice probíhat a jaký *ospC* genotyp nakonec převládne [99]. Jelikož už takto omezené studie ukazují, že kompetice je velmi složitý proces, nelze vyloučit, že za určitých podmínek může mezi různými *ospC* genotypy nastat i kooperace. Z tohoto důvodu je zapotřebí více studií zejména za přirozených podmínek, jako např.

výše zmíněná studie provedená na hraboších, abychom byli schopni pochopit vztahy různých *ospC* genotypů borreliell.

3.2.3 Variabilita ostatních SLP

Existuje skutečně rozsáhlé množství studií, které se zabývají variabilitou *ulsE* a *ospC* genů. Na druhou stranu je pouze omezené množství studií, které studují variabilitu ostatních genů SLP. První z těchto méně prostudovaných genů, u kterého lze předpokládat vysokou variabilitu, je *ospE*. Tento gen se nachází na cp32 a je součástí lokusu OspE/F příbuzných proteinů („OspE/F related proteins“, *erp*). Uvedený lokus může obsahovat několik *ospE* genů (termínem *ospE* se může označovat samotný *ospE* gen a nebo kolektivně *erp* geny), přičemž borreliella je schopná naráz exprimovat více variant těchto genů [43]. Z toho, co bylo popsáno výše, lze předpokládat, že existuje mnoho variant *erp*. Plasmid cp32 je totiž jediný potvrzený profágový plasmid [28]. Na druhou stranu ale OspE proteiny mají mezi sebou více jak 85% AA podobnost [17]. I přesto, že se jedná o AA podobnost a nev nukleotidovou, tento fakt dále ukazuje, že horizontální přenos nejspíše nehraje důležitou roli při vývoji SLP.

Dalšími důležitými a pravděpodobně dosti variabilními SLP jsou OspA a OspB, jejichž geny se nachází v jednom operonu na lp54 [109]. Podíváme-li se na *ospA* gen, zjistíme, že se svými téměř 30 rozdílnými alelami je nejspíše podobně variabilní jako *ospC* [112]. Zde ale podobnost s *ospC* nekončí. Další podobností je geografické rozložení alel *ospA*, které vykazují stejnou geografickou specifičnost jako *ospC*, a to dokonce i v případech, kdy je borreliella přenášena ptactvem, a to zejména vodním, jako např. u *B. garinii*. Skutečně i v takovýchto migrujících systémech se vyskytují alely jak *ospA*, tak *ospC*, které jsou typické pouze pro tento systém. Poslední podobnost souvisí s variabilitou, která je i v případě *ospA* nejspíše také více podmíněna rekombinací nežli samotnou mutací [50].

Oproti tomu variabilita *ospB* se příliš nestuduje. Můžeme však přihlédnout ke dvěma skutečnostem, které mohou nastínit, jak je *ospB* variabilní. Zaprvé *ospB* je schopný plně nahradit *ospA* v jeho funkci, když dojde k výměně těchto dvou genů. Zadruhé oba geny se překládají z jednoho promotoru [109]. Vzhledem k těmto faktům lze tvrdit, že na *ospB* budou působit podobné selekční tlaky jako na *ospA* a tím pádem můžeme předpokládat, že pro něho platí podobné vlastnosti jako pro *ospA* a *ospC*.

Na témže plasmidu (lp54) se nachází ještě jeden gen SLP, a to *dbpA*. I u něho můžeme předpokládat značnou variabilitu, protože jak bylo zmíněno výše, v *dbpA* je výrazně vyšší frekvence rekombinací jako u *ospC*. Naneštěstí žádná studie zabývající se přímo variabilitou *dbpA* neexistuje. Existují ale studie, které studují, jak efektivně různé proteiny DbpA kódované rozdílnými alelami vážou své cílové molekuly. Tyto studie jsou značně omezené, co se množství druhů borreliell týče, ale i přesto můžeme říct, že *dbpA* má minimálně 10 různých alel [16], které podmiňují různé tkáňové tropismy [71]. Právě

rozdílné tropismy způsobené rozdílnými alelami mohou udržovat polymorfismus *dbpA*, protože tím pádem jsou různí hostitelé ještě dále rozděleni na různé ekologické niky. Počet těchto nik by v takovém případě určoval množství *dbpA* alel a kompetice by probíhala pouze mezi druhy, které by obsahovaly alelu *dbpA* podmiňující stejný tkáňový tropismus ve shodném hostiteli. Žádné studie na toto téma ale neexistují.

Poslední SLP, jehož gen se nachází na plasmidu, přesněji na *lp36*, je BBK32. O variabilitě genu *bbk32* moc studií není, i přesto se ale nejspíše jedná o vcelku variabilní gen, jak naznačuje studie, která se zaměřovala na rozdílnou strukturu a funkci různých proteinů BBK32. V této studii byli zahrnuti pouze 3 nejčastější původci LB, kteří obsahují samotný protein BBK32 a nebo jeho homology. *B. burgdoreferi* kóduje BBK32 a homology k tomuto proteinu kódují *B. garinii* (BGD19) a *B. afzelii* (BAD16). BAD16 sdílí s BBK32 90% AA podobnost, zatímco BGD19 sdílí s BBK32 pouze 70% podobnost [122]. Jelikož tři různé druhy obsahují 3 různé varianty BBK32, lze předpokládat, že variabilita genu *bbk32* není úplně zanedbatelná.

Gen posledního SLP (*BmpA*) se od všech výše zmíněných liší, protože se nachází na chromozomu, nikoliv na plasmidu. Je součástí *bmp* regionu, který obsahuje další k němu paralogní geny, a to *bmpB*, *bmpC* a *bmpD*. Gen *bmpA* může být překládán samostatně a nebo společně s *bmpB* či *bmpC* [37]. Samotný chromozom je velmi konzervovaný mezi jednotlivými druhy *borreliell* [83], ale může obsahovat i značně variabilní geny jako výše zmíněné *lmp1*. Ovšem *bmpA* nejspíše patří mezi konzervované složky genomu *borreliell*, jelikož nedávná studie ukázala, že různé druhy *borreliell* obsahují velice stabilně celý *bmp* locus obsahující všechny *bmp* geny. Z těchto paralogních *bmp* má pouze *bmpA* 3 rozlišitelné alely. Jedna z nich se ale vyskytuje výhradně v rodu *Borrelia* a zbylé dvě jsou pouze součástí genomu *B. afzelii* a *B. garinii* [9].

I přes značně malé množství informací je zřejmé, že všechny výše zmíněné geny SLP (kromě *bmpA*) jsou značně variabilní. Ovšem jelikož je o nich známo tak málo informací, není jasné, jak se tolik různých alel rozdílných genů udržuje v genomu *borreliell*. Další výzkum by měl být tedy zaměřen na variabilitu výše zmíněných SLP genů, jelikož by tak mohl být objasněn problém kooperace a kompetice různých *ospC* genotypů, protože vztahy *borreliell* v jednom hostiteli rozhodně nezávisí pouze na jednom genu.

4. Funkční a antigenní domény SLP

Jako SLP se popisují proteiny, které mají svojí první AA (Cys) na začátku N-domény modifikovanou lipidem, který je zanořený do OM [30]. V klasických gram-negativních bakteriích je lokalizace těchto proteinů učena tzv +2/+3/+4 pravidlem, kdy druh AA na pozici 2, 3 a nebo 4 od prvního Cys určuje, jestli se SLP dostane na povrch

bakterie. Lokalizace SLP borreliell i borrelií se ale žádným takovým pravidlem neřídí [69]. Namísto tohoto pravidla lokalizaci SLP určuje úsek zvaný „tether“, který se nachází před strukturovanou částí proteinu [31].

Jedná se o důležitý krátký nestrukturovaný úsek SLP, který nejspíše interaguje s periplasmatickými chaperony. Tato interakce umožňuje zaujmout proteinům částečně destabilizovanou strukturu, která je nezbytná pro správnou lokalizaci SLP na OM. To vyplývá z výsledků experimentu, který ukazuje, že každý SLP, který vytvoří funkční strukturu již v periplasmě, v ní zůstane a na povrch bakterie se nedostane [31]. Jakákoliv interakce s periplasmatickými chaperony ale prozatím nebyla demonstrována. Stejně tak doposud nebyl objasněn přesný způsob fungování Lol proteinů u borreliell.

4.1 Funkce SLP

4.1.1 Adheze ke střevům klíšťat

Životní cyklus borrelielly začíná ve střevě klíštěte. Z tohoto důvodu borreliella potřebuje takové SLP, které jí umožní adhezi ke tkáni střeva klíštěte. K tomuto účelu slouží OspA. Jeho funkce jasně vyplývá z experimentů, jelikož OspA deficientní borreliella má značně sníženou schopnost kolonizovat střeva klíštěte [109]. Když se borreliella dostane ze savčího hostitele do svého vektoru, OspA zajišťuje přichycení borrelie ve střevech skrze vazbu na klíčový receptor OspA („Tick receptor of OspA“, TROSPA). TROSPA je ale exprimován různě ve všech stádiích života klíštěte, a tudíž by některá stadia klíštěte měla být schopná přenášet borreliellu efektivněji. To ovšem neplatí, jelikož borreliella je schopná zvýšit expresi TROSPA proteinu a tím pádem zvyšovat svojí šanci na přenos v různých vývojových stádiích klíštěte [91].

Jak bylo řečeno výše, OspA a B jsou exprimovány ze stejného promotoru. Kromě stejného promotoru ale sdílejí také funkci, jelikož OspB deficientní borrelie má značně sníženou schopnost kolonizace střeva klíštěte [87] podobně jako OspA deficientní borreliella. Navíc bylo nedávno dokázáno, že OspB je funkční ekvivalent OspA, jelikož OspA deficientní borreliella, která exprimuje pouze OspB, je schopná kolonizovat střeva klíštěte s podobnou frekvencí jako borreliella s funkčním OspA i B [109]. Na rozdíl od OspA ale prozatím nebyl přesně identifikován ligand ve střevě klíšťat pro OspB.

4.1.2 Únik imunitnímu systému

Jakmile se borreliella dostane z klíštěte do nového hostitele, je okamžitě napadena imunitním systémem hostitele. Primárními zbraněmi imunitního systému při začátku infekce jsou komplementová kaskáda a fagocytóza. Komplementová kaskáda je sled aktivací různých rozpustných proteinů, jejichž výsledkem je tvorba komplexu, který vytvoří póry

v buněčné membráně bakterie, což způsobí její zničení. Tato kaskáda může být aktivovaná buď klasickou (protilátkami), alternativní (spontánně) a nebo lektinovou cestou [25]. Fagocytóza je schopnost některých buněk, například makrofágů, požírat a rozložit cizorodé organismy [26].

Pravděpodobně nejdůležitější SLP, který chrání borrelii před oběma výše zmíněnými zbraněmi imunitního systému, je OspC. Důkazem je, že borreliella, která neobsahuje *ospC* gen, je z krve hostitele odstraněna do 30 minut po infekci [25]. Způsob, jakým OspC ovlivňuje tyto důležité složky imunitního systému, byl již částečně objasněn. OspC zabraňuje aktivaci komplementové kaskády tím, že kompetituje s C2 proteinem o protein C4b. Vzájemná interakce C2 a C4b je nutná ke správnému fungování lektinové a klasické komplementové kaskády. Pokud se ale C4b naváže na OspC, obě tyto cesty jsou blokovány [25]. Po překonání komplementové kaskády se borreliella za pomoci OspC vyhne i fagocytóze, jelikož OspC alternuje schopnost fagocytózy zejména u makrofágů, kteří při jejím odstranění hrají ze všech profesionálních fagocytů nejdůležitější roli [26].

I s aktivním OspC by ale imunitní systém stále mohl ničit borreliellu pomocí alternativně aktivované komplementové kaskády. Zde ale borreliellu chrání OspE. Ten patří do povrchových proteinů vázajících regulátory komplementu („complement regulator-acquiring surface proteins“, CRASP). Existuje celkem 5 CRASP proteinů, z nichž CRASP-3 odpovídá ErpP, CRASP-4 ErpC a CRASP-5 ErpA [24]. U ErpA byla prokázána schopnost vázat lidský plasminogen, což je neaktivní forma plasminu, který u eukaryot slouží hlavně k degradaci extracelulární matrix [52]. Dále i U ErpC byla identifikována specifická schopnost, a to adheze k lidským keratynocytům, což, jak bude popsáno dále, může být způsobeno rozdílnou strukturou domény vázajících ligandy („ligand binding domain“, LBD) ErpC oproti ostatním Erp [19]. Hlavní funkcí všech Erp je ale vázat faktor H (FH), dále pak FH-příbuzné („factor H-related“, FHR) proteiny a FH-podobné („factor H-like“, FHL) proteiny. Erp na rozdíl od CRASP-1 a 2 vykazují zvýšenou afinitu k FHR proteinům a sníženou afinitu k FH proteinům. Rozdíly při vázání různých výše zmíněných ligandů se ale vyskytují i mezi jednotlivými Erp proteiny [53].

Hlavní funkcí FH proteinů je blokace komplementové kaskády zahájená alternativní cestou tím, že za jeho přítomnosti je protein C3 rozštěpen mimo jiné na protein iC3b, který na rozdíl od proteinu C3b není schopen aktivovat komplement [80]. Je tedy zřejmé, že schopnost vázat tento protein by měla být prospěšná pro jakýkoliv invazivní organismus. I přesto ale bylo dokázáno, že vazba FH proteinu není tak důležitá při infekci savčího hostitele. Pokud by byla vazba FH proteinu nutná k přežití borrelielly v savčím hostiteli, měli bychom pozorovat neschopnost přežití borrelielly, která infikovala hostitele, jenž neexprimuje FH protein. Žádný takový rozdíl ale pozorován nebyl a je tedy možné, že borreliella je schopná unikat alternativně aktivované komplementové kaskádě i jinými způsoby [121]. Fakt, že vazba FH proteinů není nezbytně důležitá, aby borreliella přežila, byl dále nezávisle potvrzen na *B. valaisiana* [102].

Další SLP, který je také schopný ovlivňovat aktivaci komplementové kaskády, je BBK32. Ten váže C1 protein komplementové kaskády. Tento protein se skládá z C1q, ze dvou C1s a dvou C1r podjednotek. Pokud se C1q naváže na protilátku na bakterii, zahájí kaskádu, která vede k aktivaci komplementu. BBK32 zabráňuje této aktivaci tím, že váže C1r, kterému touto vazbou brání v aktivaci, a zabráňuje tak klasické aktivaci komplementu pomocí C1 proteinu [47]. Dohromady OspC, OspE a BBK32 chrání *borreliellu* před všemi třemi způsoby aktivace komplementové kaskády, i když očividně existují ještě další proteiny, které tuto kaskádu ovlivňují. Oproti tomu schopnost ovlivňovat fagocytózu byla prozatím pouze nepřímo prokázána u OspC, jelikož přesný způsob interakce s makrofágy prozatím není znám [26].

Poslední SLP, který chrání *borreliellu* před imunitním systémem, je VlsE. Jeho mechanismus ochrany je ale odlišný od předchozích SLP, protože hraje důležitou roli zejména v dlouhodobé infekci. Důkazem je, že *Borrelia*, která neobsahuje VlsE a nebo obsahuje nevariabilní VlsE, je imunitním systémem odstraněna až 21 dní po infekci. Hlavním způsobem ochrany VlsE proti imunitnímu systému hostitele je tedy nejspíše zamezení působení adaptivní humorální imunitní odpovědi [97]. Jsou dva způsoby, jakými může VlsE chránit *borreliellu* před protilátkami. Prvním je potlačení adaptivní humorální odpovědi a druhým zaštitění epitopů ostatních antigenně dominantních SLP.

Humorální odpověď na *Borrelia* po infekci může být závislá na pomocných T lymfocytech („T-helper dependent“, Thd), a nebo na nich nezávislá („T-helper independent“, Thi). Různé SLP vyvolávají buď Thd (OspC), a nebo Thi (DbpA) odpověď. Rozdíl v těchto reakcích je, že pouze Thd je schopná generovat imunitní paměť. Kritická pro správnou funkci Thd jsou germinální centra, která se nachází v lymfatických uzlinách. Ty vykazují během infekce určité abnormality, které by mohly vést k porušení schopnosti imunitního systému vytvářet dlouhodobou paměť [44]. Tyto deformace ale nebyly prozatím přímo propojeny s VlsE ani v této, ani v jiných studiích.

Na druhou stranu jiná studie prokázala, že VlsE nejspíše umožňuje uniknout imunitnímu systému, jelikož stericky brání přístupu protilátek k některým antigenně dominantním epitopům. V této práci byly myši opakovaně imunizovány *borreliellami* s nefunkčním *vlsE* genem. V případě, že byla myš imunizována pouze jednou, byla následně náchylná k nákaze VlsE exprimující *borreliellou*. Myši, které ale byly imunizovány několikrát, byly následně imunní vůči *borrelielle* obsahující funkční VlsE. Postupná imunizace totiž vytvořila dostatečné množství protilátek proti epitopům, které nejsou antigenně dominantní a zároveň nejspíš nejsou VlsE chráněné. *Borrelia* s funkčním VlsE mohla být tedy účinně zničena [13]. Vytvoření dlouhodobé paměti nebylo tedy nikterak vážně narušeno.

Navíc schopnost VlsE zakrývat většinu dominantních epitopů byla nedávno dokázána při studiu Arp, což je antigenně dominantní protein *borreliell*. V experimentu s nevariabilním VlsE bylo dokázáno, že pasivní imunizace Arp protilátkami umožnila

odstranit infekci, pokud *borreliella* neexprimovala VlsE. Zároveň přímá imunofluorescence ukázala, že detekce *borreliell* pomocí Arp protilátek byla možná pouze za nepřítomnosti VlsE. Pokud ale bylo k detekci použito více protilátek proti různým antigenům, *borreliella* byla detekovatelná i za přítomnosti VlsE. Z toho vyplývá, že VlsE vzhledem ke své ohromné variabilitě a antigenní dominanci umožňuje zakrytí některých dalších méně variabilních antigenně dominantních epitopů jiných proteinů [76].

4.1.3 Diseminace a kolonizace

Poté, co *borreliella* úspěšně odvrátí imunitní odpověď na místě prvotní infekce, potřebuje dále diseminovat. I zde pomáhá *borrelielle* OspC. Ten má totiž, kromě výše zmíněných vlastností, také schopnost vázat plasmin. Vazba tohoto proteinu *borrelielle* velmi usnadní únik z tkáně [89]. Navíc nové studie ukazují, že OspC je schopný dále vázat i fibrinogen, důležitý protein koagulační kaskády. Společně s plasminem na svém povrchu může tedy *borreliella* pronikat skrze extracelulární matrix a zamezovat i koagulační kaskádě, což dále usnadní únik z prvotního místa infekce [18].

Po dosažení krevního oběhu musí *borreliella* využít proteiny, které jsou schopné adheze k povrchu, jelikož bez ní nemůže dojít ke zpomalení *borrelielly* v krevním řečišti a ke kolonizaci tkání. Mezi tyto adhezivní proteiny patří dříve zmíněný BBK32, který kromě C1 proteinu dokáže také vázat glykosaminoglykany („glycosaminoglycan“, GAG). Tato vazba GAG pomocí BBK32 *borrelielle* usnadňuje infekci velkých kloubů, protože BBK32 s GAG deficientní doménou má sníženou schopnost kolonizace kloubů, ale ne jiných tkání. To ale není jediná adhezivní funkce tohoto proteinu. BBK32 je především znám, protože je schopný vázat fibronectin, což je součást extracelulární matrix [72].

Přesněji, BBK32 preferenčně váže rozpustný fibronectin. Existují totiž dva druhy fibronektinu: první je nerozpustný a součástí extracelulární matrix a druhý je rozpustný a součástí krevní plasmy. Oba druhy se ale skládají ze stejných podjednotek a liší se pouze svojí strukturou. Vazba BBK32 na FN70K (N-terminální doménu fibronektinu) způsobí, že v rozpustném fibronektinu dojde ke konformačním změnám, které odhalí vazebná místa pro integriny [54]. Takto navázaný fibronectin následně vytvoří s integrinem tzv. „tether bond“ neboli vláknovou vazbu, která je schopná se značně prodloužit, než je přerušena. Právě vazba *borreliella*-fibronectin-integrin umožní zpomalení *borrelielly* a následné vytvoření dalších vazeb, které zprostředkují úplnou adhezi a následnou kolonizaci tkáně [88]. Vlákenná vazba ale není nezbytná pro kolonizaci tkání, jelikož se ukázalo, že BBK32 deficientní druh *borrelielly* je schopný, i když pomaleji, plně kolonizovat hostitele zejména při vysokých inokulačních dávkách [58]. Vazba GAG ani fibronektinu pomocí BBK32 tedy není pro přežití ani kolonizaci hostitele esenciální.

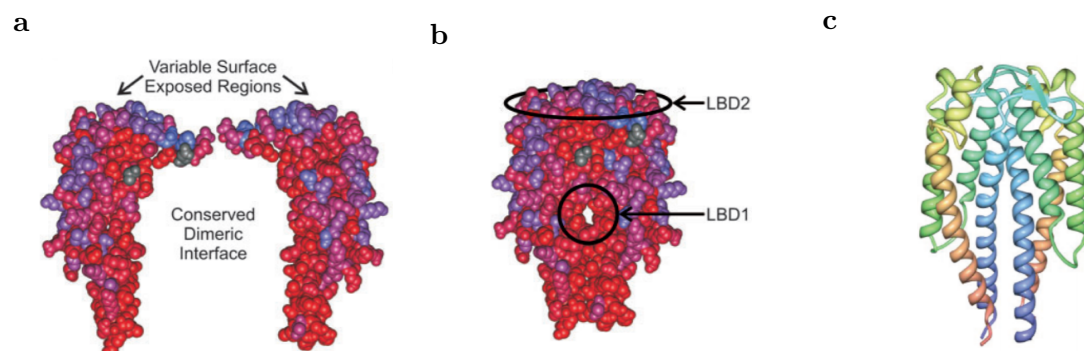
Poslední 2 SLP, které jsou důležité pro kolonizaci, jsou DpbA a BmpA. Oba tyto proteiny vážou složky extracelulární matrix. DpbA váže dekorin, což je druh GAG [100],

zatímco BmpA váže laminy [117]. Deficience v BmpA vykazuje u borrelielly podobný fenotyp jako deficience GAG domény BBK32, jelikož BmpA deficientní borreliella je (až na klouby) podobně schopná kolonizace jako BmpA exprimující borreliella [92]. Na rozdíl od BBK32 a BmpA je DbpA velmi důležitý pro celkovou kolonizaci hostitele. Důkazem je, že delece DbpA a DbpB, které se nachází ve stejném operonu, značně sníží schopnost borrelielly diseminovat a vytvořit dlouhodobou infekci v hostiteli [120].

4.2 Topologie SLP

4.2.1 OspC

OspC protein je homodimer, který je tvořený dvěma monomerními jednotkami. Každá jednotka obsahuje 2 β -vlákna (β -1 a 2) a 5 α -helixů (α -1 až 5) (viz Obr. č. 6c), přičemž interakce mezi monomery je zprostředkováná α -1 obou monomerů. Variabilita OspC je soustředěna na povrchové oblasti proteinu, zatímco jeho jádro je značně konzervované (viz Obr. č. 6a). Variabilní oblasti proteinů nejsou většinou pro funkci příliš důležité. V případě OspC se ale předpokládá LBD2 nachází právě v této variabilní oblasti. LBD1 se oproti tomu vyskytuje ve více konzervované oblasti (viz Obr. č. 6b) [41]. Tyto dvě LBD ale nejsou dostatečné k vysvětlení všech čtyř funkcí OspC. Lze tedy předpokládat, že OspC obsahuje ještě další neidentifikované LBD.



Obrázek č. 6: a: Monomerní jednotky OspC. Na jednotlivých jednotkách jsou vyznačené variabilní a konstantní regiony OspC proteinu. **b: Funkční homodimer OspC.** Šipky vyznačují LBD na OspC homodimeru. Na obou obrázcích barvy od červené po modrou vyznačují míru variability. Červená značí konzervované oblasti, zatímco modrá značí vysoce variabilní oblasti. [41] **c: Kreslená struktura OspC.** Protein je vybarven od N-terminální domény (modrá) po C-terminální doménu (červená). [14]

Vzhledem k velké variabilitě OspC by se dalo očekávat, že jednotlivé varianty OspC mají různou afinitu ke svým ligandům. Takováto rozdílná afinita byla demonstrována u vazby fibrinogenu. Ten obsahuje dvě domény, a to D a E, přičemž s OspC specificky interaguje doména E, a to tak, že 2 fibrinogeny se vážou paralelně vůči sobě a centrem této vazby je právě OspC. Tato vazba je ale závislá na elektrostatickém potenciálu povrchu OspC a nejlepší vazbu k fibrinogenu vykazují varianty OspC s neutrálně nabitým povrchem [18]. Stejně tak i v případě plasminogenu bylo pomocí cílené mutagenese

dokázáno, že vazba je ovlivněna různými elektrostatickými potenciály [41].

Podobně jako vazba fibrinogenu je i vazba C4b ovlivněna přítomností různých variant OspC. Rozdílná afinita C4b k různým OspC variantám byla sice experimentálně prokázána [25], na druhou stranu důvod této rozdílné afinity prozatím zkoumán nebyl. Je ale možné, že i zde hrají roli elektrostatické potenciály různých OspC variant. Struktura OspC je totiž velmi konzervovaná mezi různými druhy borreliell [41]. Z toho lze usuzovat, že strukturní změna nemá velkou roli při vazbě žádného ligandu.

Afinita různých ligandů k různým OspC variantám je dnes dosti zkoumaná, ovšem kde přesně dochází k jednotlivým interakcím s různými ligandy OspC proteinu, nebylo prozatím dostatečně objasněno. Ani jednomu z uvedených ligandů dodnes nebyla přiřazena žádná LBD. Pouze v případě plasminogenu bylo dokázáno, že se pravděpodobně váže mimo LBD1 [41].

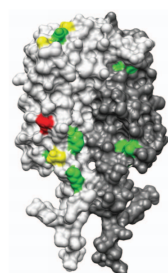
Kromě ligandů a LBD je dalším důležitým parametrem OspC jeho antigenicita. Obsahuje totiž mnoho epitopů, které jsou cílem protilátkové odpovědi imunitního systému. OspC je značně antigenní a otázkou tedy je, jaké epitopy OspC jsou vhodné pro klinické využití. Všeobecně se mohou využívat lineární a strukturní epitopy. Strukturní epitopy jsou vystaveny povrchu nativního proteinu a mohou být složeny z různých AA, které spolu v primární struktuře nesousedí [36]. Oproti tomu lineární epitopy jsou tvořeny AA, které spolu v primární struktuře sousedí a nemusí být plně vystaveny na povrchu nativního proteinu [5].

U OspC se nejčastěji studují lineární epitopy, jako např. C1 (peptid obsahující prvních 20 AA od C-konce OspC). Ten je dominantně antigenní a navíc dosti konzervovaný mezi různými variantami OspC. Dokonce má při detekci větší sensitivitu než komerčně dostupný PepC10 (peptid obsahující prvních 10 AA od C-konce OspC). I přesto je ale jeho senzitivita při detekci nedostatečná a měl by se tedy využít pouze jako součást multi-peptidové detekce [5].

Další studie nezávisle potvrdila, že konzervovaný peptid PepC10 není nikterak důležitý pro dostatečnou imunitní odpověď. Hlavně ale ukázala, že reakce organismů proti různým OspC je specifická a imunita vůči jedné alele neposkytuje ochranu proti jiné [60]. To tedy naznačuje, že antigenní motivy se nacházejí zejména ve variabilní oblasti OspC, což může být značně problematické, protože aby se mohly epitopy využít, musí být specifické, konzervované a ideálně reaktivní napříč variantami OspC. Další studie ale ukázala, že i když se dosti potenciálních epitopů nachází ve variabilním úseku OspC, může tato oblast obsahovat i epitopy, které jsou reaktivní mezi jednotlivými OspC variantami (viz Obr. č. 7) [14].

Variabilita OspC je skutečný problém při jeho využití v klinické praxi. Nedávno se ale začaly využívat tzv. „chimeritopy“, které by mohly být potenciálním řešením. Chimeritop je protein, který obsahuje několik stejných epitopů z různých variant stejného proteinu a navíc je nestrukturovaný, což je důležité pro jeho funkci, jelikož pouze tak jsou

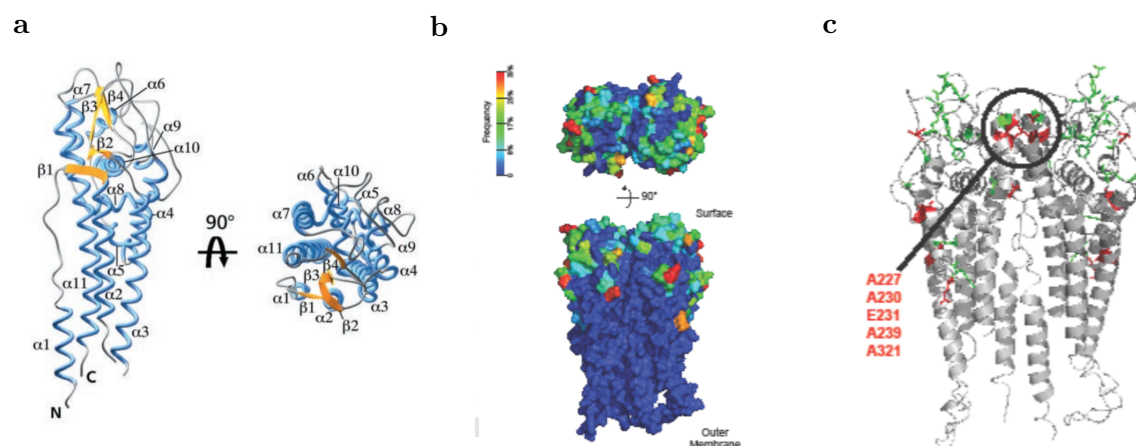
všechny epitopy dostupné a mohou být proti nim vytvořeny protilátky. V nedávné studii byla posouzena schopnost tří různých chimeritopů OspC vyvolávat protilátkovou odpověď. Tyto chimeritopy obsahovaly epitopy variabilní části OspC z různých variant OspC. I přes svoje odlišnosti dokázaly všechny chimeritopy velmi dobře indukovat tvorbu protilátek proti mnoha OspC variantám. Vyprodukované protilátky měly navíc značně velký baktericidní účinek (přes 75 %) v *in vitro* podmínkách [61]. To jasně dokazuje, že chimeritopy budou velmi důležité pro další pokrok ve výzkumu vakcíny proti LB.



Obrázek č. 7: Model OspC s potenciálními antigenními oblastmi. Pět oblastí se nachází na α -1 a dvě na α -5. Červená (nízká), žlutá (střední) a zelená (vysoká) značí reaktivitu protilátek mezi různými OspC variantami. [14]

4.2.2 VlsE

VlsE protein je také homodimer, jehož monomer se skládá ze 4 β -vláken (β -1 až 4) a 11 α -helixů (α -1 až 11) (viz Obr. č. 8a) [42]. Na rozdíl od OspC neobsahuje žádné patrné LBD, což vyplývá z jeho ochranné funkce. Nicméně obsahuje velké množství různých smyček, které pokrývají většinu obnaženého povrchu proteinu. Vzhledem k funkci VlsE není překvapivé, že tyto smyčky jsou součástí variabilního regionu VlsE (viz Obr. č. 8b). Ale i tyto variabilní smyčky obsahují konzervované oblasti, jako např. oblast vyznačená na Obr. č. 8c, která je důležitá pro tvorbu dimerické struktury [115].



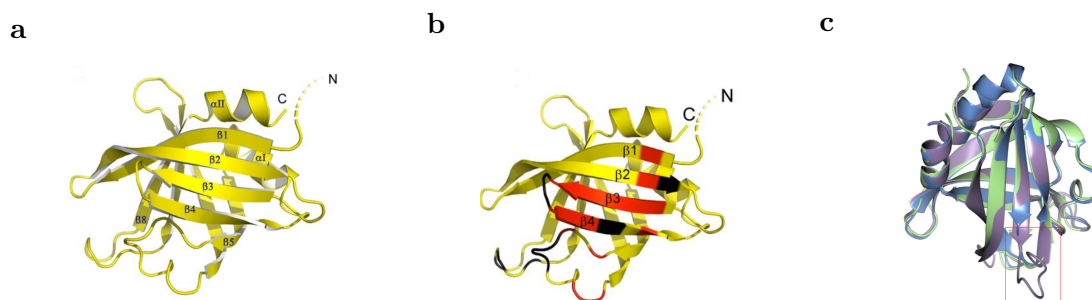
Obrázek č. 8: a: **Monomer VlsE.** Na obrázku jsou vyznačeny α -helixy (modrá) a β -vlákna (oranžová) [42]. b: **Variabilita VlsE.** Mapa znázorňuje míru frekvence, se kterou dochází k záměně AA. c: **Dimerická struktura VlsE.** Na dimeru VlsE jsou vyznačeny variabilní (zelené) a konzervované (červené) oblasti. Kruh vyznačuje AA důležité pro tvorbu dimerické struktury. [115]

VlsE je stejně jako OspC značně antigenní. Ovšem na rozdíl od OspC jsou protilátky cílené zejména na konzervované oblasti VlsE. Přesněji řečeno se jedná o konzervované oblasti nacházející se mimo variabilní oblast a konzervované oblasti samotné variabilní oblasti proteinu. Variabilní úsek VlsE totiž obsahuje nevariabilní oblasti („invariable region“, IR) 1-6 a variabilní oblasti („variable region“, VR) 1-6. U člověka jsou zejména antigenní C-terminální oblast konzervované oblasti a IR6 variabilní oblasti [98]. Jiná studie ale ukázala, že více protilátek je u člověka produkováno proti IR4 a 5 [119].

Ať už je nejvíce dominantní jakýkoliv epitop, důležitější je, že reakce na různé epitopy VlsE není náhodná. Pacienti se dají dobře rozdělit na různé skupiny, které reagují na specifické epitopy VlsE. Přesněji byly identifikovány 2 skupiny, z nichž první skupina reagovala preferenčně na IR4 a 5 a druhá skupina reagovala na C a N-terminální domény VlsE proteinu [119]. Tento fakt by se mohl využít při detekci borreliely. K tomu bude ale zapotřebí větší množství studií, zahrnující velké množství pacientů, aby všechny protilátkové skupiny mohly být s dostatečnou přesností identifikovány.

4.2.3 OspE

OspE mají mezi sebou na rozdíl od OspC a VlsE vysokou sekvenční podobnost, a to mezi stejnými i různými druhy borreliell. Zajímavé ale je, že jejich terciální struktury nejsou tak konzervované jako u OspC či VlsE. Obsahují 2 α -helixy (α -1 a 2) a 8 β -vláken (β -1 až 8), které se skládají v opakovaném pořadí 4 β -vláken a 1 α -helixu (viz Obr. č. 9a). Zároveň obsahují prozatím jednu identifikovanou LBD, která je schopná vázat FH (viz Obr. č. 9b) [17]. Ale vzhledem k schopnosti různých Erp vázat i plasminogen nejspíše obsahuje i další neznámou LBD.



Obrázek č. 9: a: Struktura OspE. Na obrázku jsou popsány jednotlivé α -helixy a β -vlákna. **b: OspE s vyznačenou LBD.** Na struktuře jsou vyznačeny části 4 β -vláken, které se podílejí na vazbě s FH (červená). Černé části se na vazbě nepodílejí. [17]. **c: Překrytí struktur OspE, ErpC a ErpP.** Na obrázku jsou zobrazeny překrývající se struktury OspE (modrá), ErpC (fialová) a ErpP (zelená). Vyznačené místo ukazuje důležitý rozdíl LBD mezi vlákny β 3 a β 4. [21]

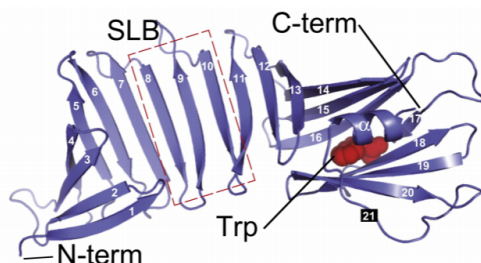
Ligand OspE proteinů FH se skládá z 20 domén. Z těchto domén se na vazbě s OspE proteiny podílí pouze doména 20, která s OspE vytvoří 13 vodíkových můstků, které stabilizují jejich interakci. Interakce OspE a FH zároveň stericky nebrání interakci s C3 proteinem, která chrání borrelielu před komplementem [67]. Interakce s FH musí být ale alespoň částečně rozdílná u některých Erp, jelikož jak bylo řečeno výše, Erp

vykazují oproti sobě rozdílnou afinitu k FH. Důvod rozdílné afinity je nejspíše v částečných rozdílech ve struktuře LBD OspE proteinů. AA podílející se na vazbě s FH jsou sice relativně konzervované [17], ale např. ErpC obsahuje významné prodloužení smyčky, která propojuje vlákna $\beta 3$ a $\beta 4$ (viz Obr. č. 9c). Tato delší smyčka nejspíše stericky brání vazbě s FH [21]. Je ale možné, že právě tento rozdíl umožňuje ErpC vázat lidské keratinocyty. Hlavní rozdíly v ligandech a v afinitách k těmto ligandům OspE proteinů jsou tedy pravděpodobně způsobeny strukturálními změnami v LBD, i když způsoby vazby ostatních ligandů, jako FHR a FHL proteinů, nebyly prozatím dostatečně studovány.

OspE proteiny jsou, jak bylo řečeno výše, značně konzervované a jejich AA podobnost je více než 85% [17]. I přesto se ale žádné studie příliš nezabývají porovnáváním velkého množství OspE proteinů a identifikací dalších konzervovaných epitopů, které by se mohly stát potenciálním cílem diagnostiky. Jediný prozatím jasně určený a konzervovaný epitop je právě výše zmíněná LBD FH.

4.2.4 OspA a OspB

OspA má mezi všemi SLP jedinečnou topologii. Plně složený OspA obsahuje N-terminální doménu ($\beta 1-7$) a C-terminální domény ($\beta 12-\alpha$), které jsou obě globulární. Tyto domény jsou navzájem spojeny neglobulární doménou (SLB), která obsahuje 4 β -vlákna, ($\beta 8-11$) uspořádaná pouze v jedné vrstvě. Dohromady tedy obsahuje 21 β -vláken a 1 α -helix (viz Obr. č. 10) [66].



Obrázek č. 10: Struktura OspA. Na obrázku jsou vyznačeny C-terminální doména (C-term), N-terminální doména (N-term), jednovrstevnatá β -doména (SLB) a jediný Trp v molekule OspA, důležitý pro studium změny konformací. [77]

Vazebná místa pro TROSPA byla identifikována především v $\beta 18-20$ [90]. Specifické AA (236–237, 242–244) nutné pro vazbu jsou ale zanořené v nativní konformaci OspA, a tudíž nedostupné. I přesto je OspA očividně schopné vázat TROSPA. Důvodem je, že za fyziologických podmínek se OspA nevyskytuje pouze v nativní konformaci. OspA je dále schopné zaujmout dvě jiné konformace, a to částečně rozbalenou, kdy je rozbalená právě C-terminální doména obsahující vazebné místo pro TROSPA, a plně rozbalenou formu [66]. Důležitost částečně rozbalené formy jasně indikuje další nezávislá studie, kde bylo prokázáno, že skládání nativní formy je jasně dáno. Nejdříve dojde k rychlému složení N-terminální domény a vytvoření částečně složeného proteinu. Až po složení N-terminální domény může teprve dojít k výrazně pomalejšímu skládání C-terminální domény. [77].

To znamená, že částečně složená forma může být docela častá a je tedy možné, že hraje důležitou roli při interakci s TROSPA.

C-terminální doména není důležitá pouze pro interakci s TROSPA. Je podstatná také proto, že se na ní nachází antigenní epitop OspA. Tento strukturní epitop se skládá ze 3 lineárních částí: β 16 a 17 (AA 203-220), β 18 a 19 (AA 224-233) a β 20 a 21 (AA 246-257). Všechny tyto úseky patří mezi nejvíce variabilní části OspA, což značně ztěžuje využití tohoto epitopu [36].

Další nedávná studie určila tentokrát lineární epitop, který se značně překrývá s výše zmíněnou částí strukturního epitopu (AA 224-233) a je dokonce podobný epitopu vyskytující se v OspB. Tento identifikovaný epitop by se mohl potenciálně stát součástí chimeritopní vakcíny, podobně jako v případě OspC [59]. Ovšem u OspA míří výzkum spíše ke strukturním epitopům, jak ukazuje vývoj tří nových vakcín.

První z nich je VLA15, která se nyní nachází ve 2. fázi klinických testů (registrační čísla: [NCT03769194](#) a [NCT03970733](#)). Vakcína se skládá ze 6 C-terminálních domén, které obsahují OspA sérotypy 1-6. C-terminální domény jsou stabilizované disulfidickými můstky, aby se zajistilo správné složení strukturních epitopů. V konečné vakcíně se nachází 3 proteiny, z nichž každý obsahuje dvě C-terminální domény různých sérotypů propojené linkerem [32]. Druhá vakcína také obsahuje C-terminální doménu OspA, ale na rozdíl od VLA15 obsahuje pouze jeden protein složený ze dvou C-terminálních domén spojených linkerem. Každý C-terminální fragment je upraven tak, aby obsahoval některé ze strukturních epitopů OspA sérotypů 1-6 [86]. Poslední vakcína oproti oběma předchozím využívá celý nativní OspA a sérotypy 1-5 a 7. Nosičem celého OspA je ferritin, což je protein pocházející z *Helicobacter pylori*, který se spontánně skládá do nanočástic oktaedrálního tvaru, obsahujících celkem 24 monomerů. Vakcína obsahuje celkem 6 nanočástic, z nichž každá nese jeden OspA sérotyp [63].

Všechny zmíněné vakcíny dokázaly indukovat tvorbu protilátek, které následně ochránily myši proti infekci borreliell. Imunizace VLA15 byla dostatečně účinná při proteinové dávce 0,3 μ g s nejmenší ochranou proti sérotypu 6 při dávce 3 μ g. V celém experimentu bylo použito přes 350 myší a OspA sérotypy borreliell 1, 2, 4, 5 a 6 [33]. Druhá zmíněná vakcína sice indukovala dostatečnou ochranu už při 0,03 μ g proteinu, ale testy byly provedeny pouze na 130 myších a na OspA sérotypech 1 a 2 [86]. Poslední vakcína, obsahující celý nativní protein, byla testována pouze při dávce 1 μ g na 40 myších a na OspA sérotypu 2. Dlouhodobá imunitní paměť byla demonstrována pouze u VLA15 vakcíny trvající 50 týdnů [33] a u ferritinové vakcíny trvající 25 týdnů [63]. I přestože všechny výše zmíněné vakcíny dokázaly indukovat protilátky proti testovaným sérotypům, správné zhodnocení jejich účinnosti by vyžadovalo porovnatelné klinické testy, jakými právě prochází vakcína VLA15.

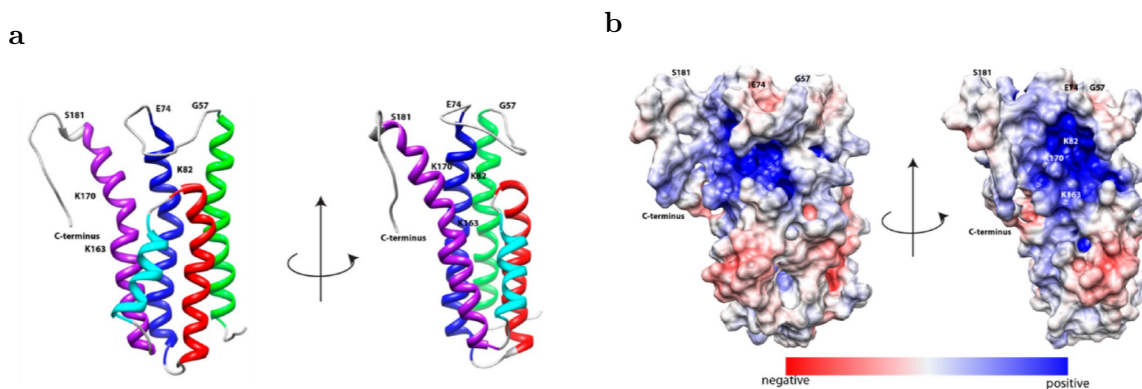
S novými vakcínami by mohl teoreticky pomoci i OspB. Ten má velmi velkou AA podobnost s OspA a navíc jejich struktury jsou do určité míry podobné. Celá struktura

OspB nebyla prozatím získána. I tak je jasné, že je jejich struktura značně podobná. Jediný rozdíl je, že OspB obsahuje několikaaminokyselinovou inzerci ve své N-terminální doméně, což naznačuje možnou přítomnost 1 β -vlákna navíc oproti OspA. To prozatím nebylo potvrzeno, jelikož dodnes byla zjištěna topologie pouze C-terminální domény OspB. Ta je ale značně podobná OspA a také obsahuje podobnou LBD. Dokonce obsahuje i podobné antigenní epitopy, jak bylo řečeno výše [15]. Celkově je ale OspB málo studovaný a jeho využití ve vakcínách tedy vyžaduje více informací.

4.2.5 DbpA

DbpA je tvořen 5 α -helixy (α -1 až 5), z nichž tři jsou orientovány paralelně vůči sobě (α 3-5) a dva jsou orientovány antiparalelně oproti nim (α 1 a 2) (viz Obr. č. 11a). Takto poskládané helixy způsobují, že C-terminální doména proteinu je ve značné blízkosti se smyčkou, která propojuje α 1 a 2. Společně tyto dvě části DbpA vytvářejí značně bazické místo, které je všeobecně nutné k vazbě GAG [118].

Tato bazická doména obsahuje dva prvky, které jsou pro vazbu GAG nepostradatelné. První součástí je smyčka propojující α 1 a 2, která sice částečně brání vazbě GAG, ale toto sterické bránění je překonáno faktem, že obsahuje tzv. BXBB motiv (K64, D65, K66 a K67), který je velmi důležitý pro vazbu GAG [118]. Druhou částí LBD jsou 3 lysiny, které jsou viditelné na obrázku č. 11b. Mutace v jakémkoliv z těchto lysinů vede k fenotypu, který je shodný s deficiencí DbpA [46].

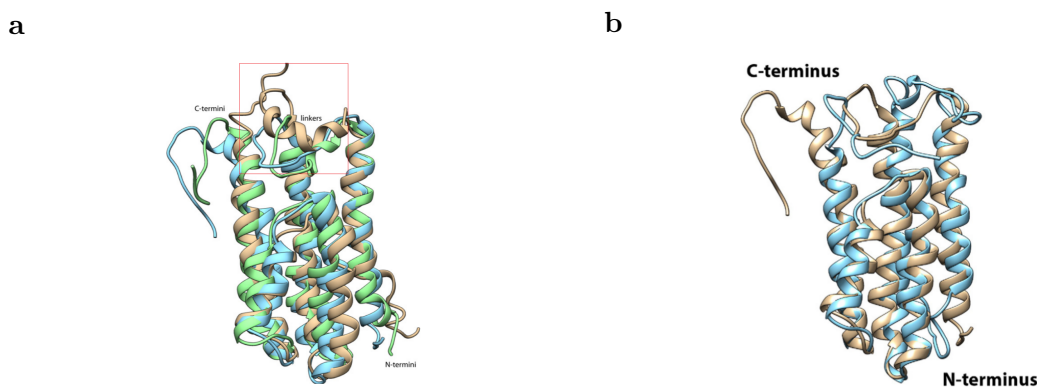


Obrázek č. 11: Struktura a mapa elektrostatického potenciálu dbpA B31. a: Znáznorňuje α -helikální strukturu DbpA. b: Ukazuje elektrostatický potenciál povrchu DbpA. Modrá znázorňuje bazická místa, zatímco červená znázorňuje kyselá místa. [118]

I když jsou oba zmíněné motivy značně důležité, nejsou plně neměnné a právě to způsobuje rozdílné afinity ke GAG různých DbpA proteinů. Studie na třech různých variantách z *B. burgdorferi* B31, N40 a *B. garinii* PBr jasně ukázala, že i když DbpA B31 a PBr mají dosti podobnou schopnost vázat GAG, DbpA N40 tuto schopnost téměř postrádá. Je zajímavé, že DbpA izolátu N40 i Pbr chybí BXBB motiv u DbpA PBr, ale existuje ještě druhá vazebná doména, která souvisí s celkovou změnou struktury. DbpA PBr totiž neobsahuje části C-terminální domény, která propojuje pomocí disulfi-

dického můstku tuto doménu a α -5 (viz Obr. č. 12a). Přerušení můstků vedlo k uvolnění C-terminální domény a k následnému vytvoření druhé GAG LBD. N40 žádnou takovou změnu nemá a má tím pádem značně sníženou afinitu ke GAG [84]. Je tedy zřejmé, že jak strukturní, tak elektrostatické změny mohou vést k různým afinitám ke GAG.

Stejně jako v případě OspA je hlavní LBD v blízkosti C-terminální domény. Ovšem oproti OspA se u DbpA v C-terminální doméně nenachází antigenní epitopy. Ty se v případě DbpA nacházejí v blízkosti N-terminální domény a uprostřed proteinu. Tyto lineární epitopy jsou velmi variabilní jak mezi stejnými, tak různými druhy borreliell, což značně snižuje možnost jejich využití při detekci, jak ukazují výsledky testů. Senzitivita těchto epitopů při detekci protilátek ve vzorcích pacientů LB byla nedostatečná, ale pokud se zkombinovala s detekcí epitopů z DbpB, bylo rázem možné určit většinu pozitivních vzorků. [6].



Obrázek č. 12: Porovnání struktur Dbp proteinů. a: Znárodnuje struktury 3 DbpA. DbpA B31 je vyznačen tyrkysově, DbpA PBr modře a DbpA N40 zeleně. Zároveň je vyznačena oblast, která se značně odlišuje u DbpA PBr. [84] **b: Ukazuje porovnání struktur DbpA (zlatá) a DbpB (modrá).** Na obrázku lze pozorovat rozdíl v C-terminální doméně mezi DbpA a DbpB. [45]

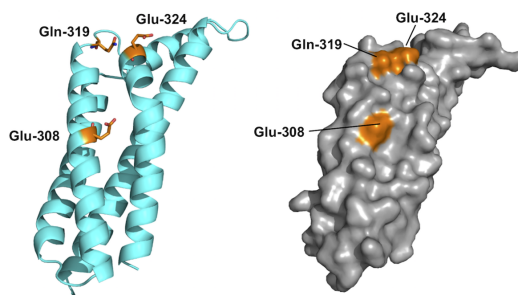
DbpB, který tak výrazně zlepšil senzitivitu detekce, je nejspíše paralog DbpA. Tyto dva proteiny si totiž jsou značně podobné jak strukturou, tak sekvencí. I přes to mezi nimi nacházíme jisté strukturní rozdíly. DbpB neobsahuje BXBB motiv, a dokonce mu chybí lysin na pozici 163, který je kritický pro vazbu GAG u DbpA. Tyto nedostatky jsou ale kompenzovány delší C-terminální doménou, která je naopak nepostradatelná pro vazbu GAG pro DbpB (viz Obr. č. 12b) [45]. Takže i přesto, že je DbpA dosti variabilní, jeho lineární epitopy mohou být užitečné při detekci, pokud se zkombinují s lineárními epitopy z DbpB v multivalentní detekci.

4.2.6 BBK32

Úplná struktura BBK32 nebyla prozatím publikována, ale existují její počítačové predikce. BBK32 pravděpodobně obsahuje 2 domény, které jsou na sobě nezávislé. Tyto domény jsou N-terminální doména (AA 1-205) a C-terminální doména (AA 206-354). N-terminální doména je složená hlavně z neuspořádaných smyček a pár β -vláken [65]. Tato β -vlákna se nacházejí ke konci N-terminální domény, kde se nachází fibronectinová

LBD, neboť jsou zapotřebí pro tvorbu vazby s fibronectinem [54]. Na druhém konci N-terminální domény se nachází neprostudovaná GAG LBD [122].

Struktura N-terminální domény prozatím nebyla objasněna. Oproti tomu struktura C-terminální domény již byla publikovaná a potvrdila předpoklady, že je značně uspořádaná, globulární a je složená především z α -helixů. Navíc obsahuje C1r LBD, na které bylo ukázáno, že různé varianty BBK32 (BAD16, BGD19) mají různou afinitu k C1r proteinu, a to zejména kvůli změně 3 AA, které jsou nezbytné pro vazbu C1r (viz Obr. č. 13) [122].



Obrázek č. 13: Struktura C-terminální domény BBK32 (AA 206-354). Obrázek ukazuje dva druhy struktur C-terminální domény BBK32 a pozice 3 AA důležitých pro C1r vazbu. [122]

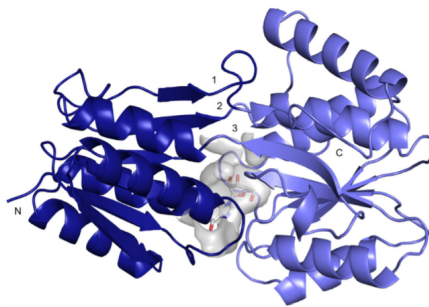
Jelikož o struktuře proteinu BBK32 není moc známo, není divu, že ani o jeho variabilitě a epitopech nebylo příliš publikováno. I přesto ale bylo v nedávné studii ukázáno, že BBK32 obsahuje ve své N-terminální doméně minimálně 2 lineární epitopy, které jsou stejně jako BBK32 velmi konzervované mezi stejnými druhy rodu *Borrelia*, ale velmi variabilní mezi různými druhy rodu *Borrelia*. Proto není překvapující, že využití těchto lineárních epitopů při detekci nepřineslo nikterak dobré výsledky ve specificitě detekce. Dokonce ani senzitivita detekce nebyla příliš vysoká, jelikož určené lineární epitopy pravděpodobně nebyly celé vystaveny na povrchu proteinu [111]. Využití BBK32 pro diagnostické i případné terapeutické účely vyžaduje další studie. Zejména musí být objasněna jeho struktura, aby mohlo být odhaleno více epitopů.

4.2.7 BmpA

Struktura BmpA byla prozatím studována pouze pomocí počítačové predikce, a to na základě sekvenční podobnosti s PnrA, což je nukleosidový transportér s ATP-vázací kazetou („ATP-binding cassette“, ABC) z *Treponema pallidum*. Na základě této podobnosti byl vytvořen model (viz Obr. č. 14), který se značně podobá PnrA proteinu i s jeho LBD pro purinové nukleosidy, jež se nachází mezi N-doménou a C-doménou BmpA proteinu. N i C-doména obsahují 6 paralelních β -vláken obklopených 4 α -helixy stejně jako PnrA. Hlavní rozdíly mezi těmito proteiny jsou v C-doméně, která obsahuje 1 dodatečný α -helix, a ve variabilních smyčkách propojující N a C-doménu [9].

Zmíněná počítačově vytvořená struktura byla nedávno potvrzena na BmpD, který sdílí s BmpA pouze 47% AA podobnost [9]. Ale i přesto odpovídá jeho struktura BmpA

téměř dokonale. Obsahuje pouze jeden α -helix, a to ve své C-doméně [35]. Navíc stejně jako všechny Bmp proteiny má značně konzervovanou nukleosidovou LBD [9]. Zarážející ale je, že BmpD pravděpodobně není vystaven na povrchu [35]. Toto zjištění bylo nezávisle demonstrováno už dříve jak u BmpD, tak i u ostatních Bmp proteinů kromě BmpA [39]. Žádná novější studie se prozatím nevěnovala BmpA a jeho schopnosti vázat laminy. Stejně tak žádná prozatím nezískala krystalickou strukturu BmpA. Všechny studie naznačují, že se jedná o nukleosidový ABC transportér. Je tedy nutné přezkoumat schopnost BmpA vázat laminy a jeho umístění na OM.



Obrázek č. 14: Predikce struktury BmpA. Na obrázku je vyznačena N-doména (tmavě modrá), C-doména (světle modrá), 3 smyčky propojující N a C-doménu a předpokládaný ligand inozitol v LBD mezi N a C-doménou.[9]

5. Komparativní analýza

Vícero vzájemně uspořádaných sekvencí („multiple sequence alignment“, MSA) je základem pro všechny programy zabývající se evoluční konzervovaností. ConSurf ani 3DPatch v tomto případě nejsou žádnou výjimkou. Pouze 3DPatch vyžaduje konvertování MSA na hmm profil pomocí HMMERu [62], což je jeden z mnoha programů schopných vytvářet MSA. Pro své výpočty využívá skrytý Markovův model [57]. Oba programy jsou také schopné přijímat samostatné sekvence, a to proteinové a RNA v případě ConSurfu a pouze proteinové v případě 3DPatche. Tyto sekvence jsou využity k prohledávání různých databází a z výsledku tohoto vyhledávání se vytvoří opět MSA. K prohledávání databází i k vytvoření MSA ConSurf nabízí několik různých programů, zatímco 3DPatch využívá pouze HMMER. Na základě MSA nebo vytvořeného hmm profilu programy vypočítají, jak je daná pozice v makromolekule konzervovaná [8, 62]. Způsoby těchto výpočtů se ale liší.

V případě 3DPatche se pro určení konzervovanosti nebo variability využívá tzv. „information content“ neboli informační obsah. Ten značí důležitost dané pozice v makromolekule na základě výpočtů entropie. Pozice, které je přiřazena vysoká hodnota, je konzervovaná, a tudíž biologicky důležitá [68]. Oproti tomu ConSurf přiřazuje pozicím v makromolekule rychlost evoluce, vypočtenou pomocí bayesovské metody a nebo metody

maximální věrohodnosti. V tomto případě naopak nízká hodnota značí konzervované pozice. Důležitý rozdíl oproti 3DPatchi je, že při výpočtech se bere v potaz i fylogeneze dané makromolekuly. Navíc bayesovská metoda přiřazuje každé evoluční rychlosti interval spolehlivosti, který určuje přesnost výpočtu [8]. Vypočtené hodnoty jsou nakonec u obou programů promítnuty na strukturu proteinu nebo i RNA u ConSurfu.

5.1 Metodika

Při své analýze jsem využil DNA sekvence získané programem BLAST z Národního centra biotechnologických informací („National Center for Biotechnology Information“, [NCBI](#)) [12]. Pro BLAST jsem využil sekvence JN969070.1, EU135607.1 a KJ850255.1 pro OspC a MH509399.1 (využité nukleotidy: 1091-2215), AY052626.1 a U84554.1 (využité nukleotidy: 42-1112) pro VlsE. Stažené sekvence jsem následně sloučil do dvou FASTA souborů, jeden pro OspC a jeden pro VlsE. Dále jsem si stáhl sekvence 1GGQ (OspC) a 1L8W (VlsE) z [PDB](#), které jsou potřebné k promítání výsledků analýzy na proteinovou strukturu. Všechny tyto 4 FASTA soubory jsem nahrál do pracovního adresáře R studia a všechny DNA sekvence jsem přeložil pomocí R kódu #1 (viz přílohy) [95]. Z přeložených sekvencí jsem vytvořil MSA pomocí programu [MAFFT](#), který vytváří MSA pomocí rychlé Fourierovy transformace [2]. Dále jsem z MSA vytvořil hmm profil pomocí programu HMMER funkcí hmmbuild [57]. Parametry všech uvedených programů jsou uvedeny v Tab. č. 2. MSA a hmm profil jsem využil jako vstupní data pro ConSurf a 3DPatch. Po dokončení výpočtů jsem si z ConSurfu stáhl soubor s názvem „Amino Acid Conservation Scores, Confidence Intervals and Conservation Colors“. Z výsledků 3DPatche jsem si otevřel odkaz „Profile HMM information content calculation“ z protokolu a stáhl jsem si JSON soubor. Oba tyto soubory jsem nahrál do pracovního adresáře R studia, abych vytvořil Vennovy diagramy pomocí R kódu #2 (viz přílohy).

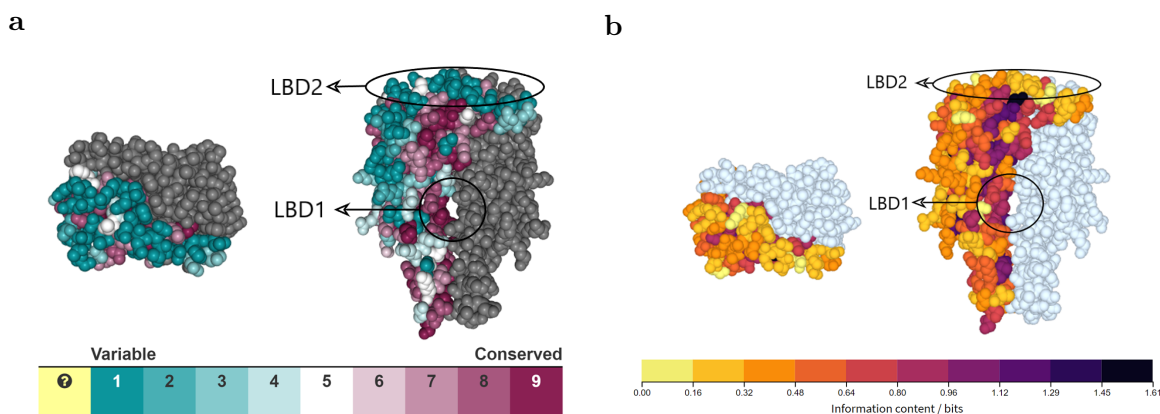
Protein	BLAST	MAFFT	hmmbuild
OspC	<i>database: wgs a nr/nt</i> <i>max target sequences: 5000</i> <i>match/mismatch: 1/-1</i> <i>percent identity: 0-95</i> <i>query coverage: 75-100</i>	<i>strategy: G-large-INS-1</i> <i>memory usage: Normal mode</i>	výchozí nastavení
VlsE	<i>database: wgs a nr/nt</i> <i>max target sequences: 5000</i> <i>match/mismatch: 1/-1</i> <i>percent identity: 0-95</i> <i>query coverage: 40-100</i> <i>E value: 1e-30</i>	<i>strategy: G-large-INS-1</i> <i>memory usage: Normal mode</i>	<i>-fast</i> <i>-symfrac 0</i> <i>-fragthresh 0.95</i>

Tabulka č. 2: Parametry všech využitých programů. Názvy parametrů jsou pro lepší srozumitelnost a reprodukovatelnost uvedeny v angličtině.

5.2 Výsledky

Pro porovnání schopnosti obou programů určovat konzervované motivy jsem využil dva v práci podrobně rozbrané proteiny: OspC a VlsE. Tyto proteiny jsem si vybral, jelikož se jedná o nejvíce variabilní proteiny borreliell, které i přesto zachovávají konzervovanou terciální strukturu. Navíc dostupné OspC sekvence pokrývají většinou téměř celý protein a jsou velmi dobře anotované. Oproti tomu dostupné sekvence VlsE genu jsou leckdy nejasně anotované a navíc primárně pokrývají pouze variabilní úsek VlsE. Zejména tyto rozdíly v sekvencích určí, jak dobře si programy dokážou poradit s ideálními daty v podobě OspC a s neideálními daty v podobě VlsE.

Výsledky obou programů jsou velmi podobné v případě OspC. Většina nejvíce variabilních AA byla určena na povrchu OspC. Oproti tomu hydrofobní jádro proteinu bylo určeno jako značně konzervované. Mezi konzervované úseky patří také LBD1, což potvrzuje, že by se skutečně mohlo jednat o LBD. Oproti tomu pozice LBD2 byla určena jako velmi variabilní a pouze pár AA v této LBD bylo určeno jako konzervované (viz Obr. č. 15). Je tedy nutné experimentálně ověřit, jestli je LBD2 skutečnou LBD.

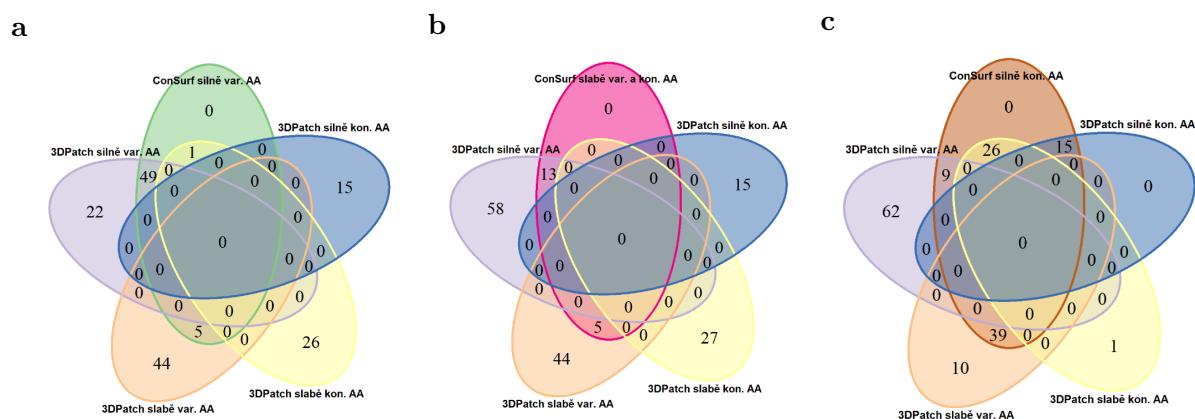


Obrázek č. 15: Výsledky analýzy promítnuté na OspC. a: Ukazuje výsledek ConSurfu. Vpravo je pohled na OspC zepředu s vyznačenými LBD. Vlevo je pohled na LBD2 shora. Škála ukazuje míru variability, přičemž variabilita klesá od tyrkysové po fialovou. **b: Ukazuje výsledek 3DPatche.** Vpravo je pohled na OspC zepředu s vyznačenými LBD. Vlevo je pohled na LBD2 shora. Škála ukazuje míru variability, přičemž variabilita klesá od žluté po černou.

Abych dále porovnal schopnost obou programů, rozdělil jsem si AA podle pozice v proteinu a míry konzervovanosti. U Consurfu jsem vytvořil 3 skupiny: silně variabilní AA, slabě variabilní a slabě konzervované AA a silně konzervované AA. U 3DPatche jsem vytvořil 4 skupiny: silně variabilní AA, slabě variabilní AA, slabě konzervované AA a silně konzervované AA. Důvodem rozdílného počtu vytvořených skupin u ConSurfu a 3DPatche je, že 3DPatch vytvoří při výpočtech u AA celkem 10 skupin, zatímco ConSurf vypočte pouze 9 skupin (viz škály na Obr. č. 15). Vytvořené skupiny tedy v obou extrémech (silně variabilní a silně konzervované) jak u 3DPatch, tak u ConSurfu obsahují 3 původně vypočtené skupiny, aby se zajistila dobrá porovnatelnost extrémních hodnot. Zbýlé 2 skupiny u 3DPatch obsahují po dvou původních vypočtených skupinách.

Podobné rozdělení ovšem nebylo možné u ConSurfu, jelikož obsahuje lichý počet původně vypočtených skupin a navíc vypočtená hodnota 5 nelze zařadit ani mezi slabě variabilní nebo konzervované. Přesná variabilita jednotlivých AA určená 3DPatchem i ConSurfem lze vidět při práci s R kódem #1.

Na základě vytvořených skupin jsem vygeneroval Vennovy diagramy. Abych se ujistil o správném rozdělení AA, výsledné Vennovy diagramy obsahují pět skupin: 1 z ConSurfu a 4 z 3DPatche. Jestliže bylo rozdělení správné, měli bychom pozorovat nenulové hodnoty pouze mezi dvěma množinami, které pocházejí od různých programů, což je na diagramech jasně viditelné. Výsledky Vennových diagramů dále ukazují, že oba programy si u OspC vedly podobně. Na Obr. č. 16a vidíme, že většina silně variabilních AA ConSurfu spadá do silně variabilních AA i v 3DPatchi. Stejně tak málo variabilní nebo konzervované AA ConSurfu spadají do silně nebo málo variabilních AA 3DPatche (viz Obr. č. 16b), což lze považovat za podobné výsledky. Mnoho silně konzervovaných AA ConSurfu ale spadá do slabě variabilních v 3DPatchi (viz Obr. č. 16c), což naznačuje, že 3DPatch má potíže s rozlišením variabilních a konzervovaných AA.

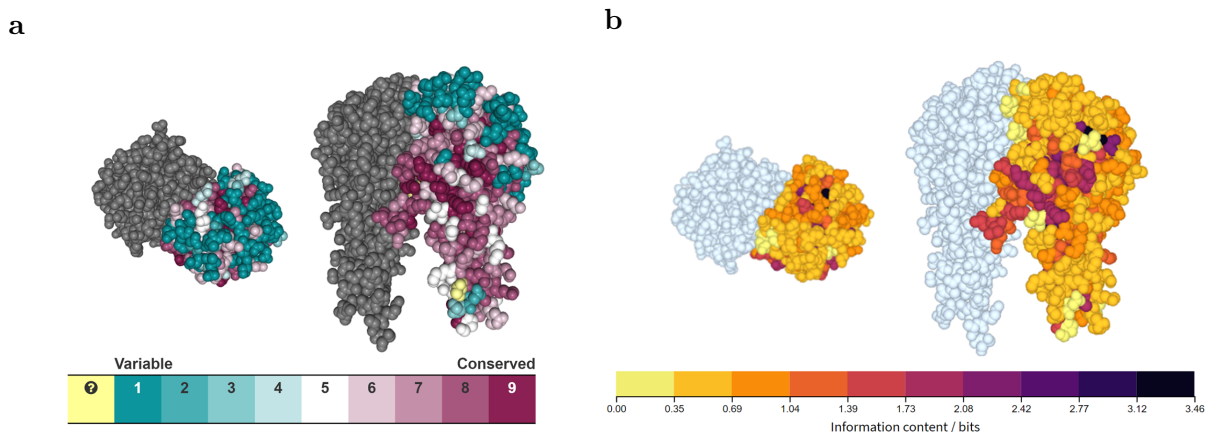


Obrázek č. 16: Výsledky analýzy OspC zobrazené Vennovými diagramy. a: Porovnání silně variabilních AA ConSurfu se všemi skupinami z 3DPatche. **b:** Porovnání slabě variabilních a konzervovaných AA ConSurfu se všemi skupinami z 3DPatche. **c:** Porovnání silně konzervovaných AA ConSurfu se všemi skupinami z 3DPatche.

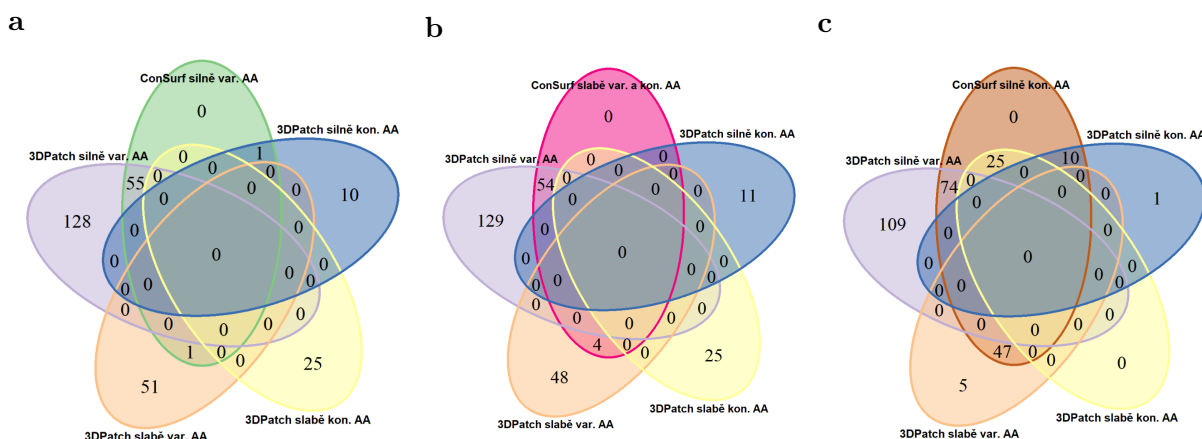
Tento problém je ještě více patrný v případě VlsE. Ten by měl obsahovat značně variabilní oblasti s pár konzervovanými oblastmi na svém povrchu a zbytek proteinu by měl být konzervovaný. I s nedostatečnými daty na koncové (konzervované) oblasti lze vidět, že ConSurf na rozdíl od 3DPatche skutečně lépe odlišil variabilní povrch od zbytku konzervovaného VlsE (viz Obr. č. 17).

Stejný problém v rozlišení variabilních a konzervovaných AA můžeme pozorovat i na Vennových diagramech. Na Obr. č. 18a můžeme vidět, že téměř všechny AA určené ConSurfem jako silně variabilní spadají do silně variabilních AA i u 3DPatche. Dále pak i skoro všechny AA vyhodnocené ConSurfem jako slabě variabilní nebo konzervované také spadají do silně variabilních AA u 3DPatche (viz Obr. č. 18b). To je ale pouze mírný rozdíl. Zásadní rozdíl je v tom, že 121 silně konzervovaných AA určených ConSurfem

spadá do silně variabilních nebo slabě variabilních AA u 3DPatche (viz Obr. č. 18c).



Obrázek č. 17: Výsledky analýzy promítnuté na VlsE. a: Ukazuje výsledek ConSurfu. Vpravo je pohled na VlsE zepředu. Vlevo je pohled na VlsE shora. Škála ukazuje míru variability, přičemž variabilita klesá od tyrkysové po fialovou. Žluté AA naznačují, že pro danou AA bylo nedostatečné množství informací pro spolehlivé určení evoluční rychlosti **b: Ukazuje výsledek 3DPatche.** Vpravo je pohled na VlsE zepředu. Vlevo je pohled na VlsE shora. Škála ukazuje míru variability, přičemž variabilita klesá od žluté po černou.



Obrázek č. 18: Výsledky analýzy VlsE zobrazené Vennovými diagramy. a: Porovnání silně variabilních AA ConSurfu se všemi skupinami z 3DPatche. b: Porovnání slabě variabilních a konzervovaných AA ConSurfu se všemi skupinami z 3DPatche. c: Porovnání silně konzervovaných AA ConSurfu se všemi skupinami z 3DPatche.

Z těchto výsledků vyplývá, že ConSurf je schopný lépe rozlišit konzervované a variabilní oblasti proteinu, a to dokonce i s malým množstvím dat. Navíc ConSurf všeobecně nabízí více možností pro práci se vstupními daty, jako např. různé programy pro prohledávání databází, možnost optimalizace parametrů pro tvorbu MSA a výpočtu evoluční rychlosti atd. Oproti tomu 3DPatch zatím nenabízí žádné možnosti optimalizace jakýchkoli parametrů. Jediný způsob jejich optimalizace je přímý zásah do zdrojového kódu. Ovšem značná výhoda 3DPatche je jeho rychlost. Zatímco ConSurf generoval výsledky až několik hodin, 3DPatch dostal výsledky za několik vteřin. To z něho dělá velmi užitečný a rychle interagující program, který lze bez problémů využít, potřebujete-li rychlé výsledky o konzervovanosti proteinu. Důležitým předpokladem ale je, že máte dostatečné množství sekvencí, které pokrývají jeho celý ORF.

6. Závěr

Nedávné vymezení rodu *Borrelia* z původního rodu *Borrelia* stále čelí vážné kritice. Ale důkazy pro toto rozdělení jsou nepopíratelné, jak uvedli dokonce samotní kritici tohoto rozdělení. Rod *Borrelia* je skutečně jedinečný svojí rozdílnou patogenitou, zvláštní fylogenezí z několika různých předků a svými patogenními adaptacemi, z nichž nejdůležitější je schopnost výměny lipidů, jelikož se tak dostávají antigenní látky do hostitelských buněk. Jasnější kategorizace borreliell oproti ostatním bakteriím může být tedy pouze ku prospěchu celé vědecké komunity.

Ovšem kromě výše uvedených vlastností borrelielly značně odlišuje i jejich genom, který může obsahovat až 23 plasmidů. Vývoj těchto plasmidů je bezprostředně spjatý s vývojem SLP genů, které určují infektivitu daného druhu. Jak pro plasmidy, tak na nich se vyskytujících SLP genů je při evoluci nejdůležitější rekombinace uvnitř jednoho plasmidu v rámci jedné borrelielly. Rekombinace mezi různými druhy může do jisté míry také ovlivňovat variabilitu plasmidů, a to zejména u cp32, které jsou potvrzenými profágy. Ovšem jelikož mnoho našich znalostí pochází z SRS a ne z LRS, mohou být tyto závěry zatížené značnou chybou vyplývající z limitací SRS.

Přestože chápeme, jak důležitou roli rekombinace u borreliell hraje, z výzkumů na *ulsE* genu vyplývá, že prozatím plně nerozumíme jejímu průběhu. Borrelielly sice obsahují homologы proteinů RuvA a B, které jsou schopné manipulovat s Hollidayovou strukturou, ale neobsahují homolog RuvC, který tuto strukturu štěpí. Z výzkumů na *ulsE* dále vyplývá zajímavý fakt o životním cyklu borreliell, a to, že po diseminaci do různých tkání v nich zůstávají a pouze se v nich lokálně množí.

Výzkum variability ostatních genů SLP a zejména výzkum *ospC* dále ukazuje, že variabilita všech SLP genů je podmíněna ohromným množstvím faktorů. Teorie NFDS a MNH by se kromě *ospC* mohly vztahovat i na *ospA* a *ospB*, jelikož jejich geografické rozložení je velmi podobné. Ovšem spíše než jedna teorie bude udržování variability různých genů SLP lépe popisovat více teorií současně. Navíc je třeba vzít v úvahu i nevyřešenou problematiku kooperace a kompetice mezi různými druhy borreliell. K pochopení variability SLP genů a vztahů různých druhů borreliell bude zapotřebí další výzkum zejména za přirozených podmínek.

Kromě mnoha neznámých v genetice borreliell je ale také mnoho neprostudovaného i v oblasti samotných proteinů. Přestože v nedávné době bylo objasněno mnoho dalších funkcí v práci zmíněných SLP, dalších alespoň 30 SLP zůstává téměř úplně neprostudovaných. Dále pak i mnohé nově identifikované funkce prozatím nebyly přiřazeny k žádným LBD. Tento problém vyplývá z faktu, že dokonce u 3 z 8 v práci vybraných SLP prozatím nebyla publikována jejich celá nativní struktura. Objasnění struktury je kritické pro vyhledávání na povrchu vystavených strukturních epitopů, ale i pro vyhledávání

lineárních epitopů, protože i ty musí být alespoň částečně vystaveny na povrchu proteinu, aby mohly být využity při detekci nebo vývoji vakcín.

Ale nedostatečné informace o SLP nejsou jedinou překážkou. Základní problém při sérologické detekci je vysoká prevalence protilátek proti borrelielle v populaci. To způsobuje, že je velmi složité rozlišit aktivní infekci od již prodělané nemoci. Řešením by mohlo být najít dostatečné množství takových epitopů, proti kterým se tvoří protilátky preferenčně během aktivní infekce, a zařadit tyto epitopy do multipeptidové detekce. To znamená, že SLP, proti kterým se tvoří protilátky výhradně Thi cestou, by mohly být odpovědí, kterou hledáme.

Problém s vakcínou je ale odlišný. Zde hraje největší roli variabilita SLP. Všechny pokusy najít jakýkoliv dostatečně konzervovaný epitop mezi více druhy borreliell, který je zároveň antigenně dominantní, do dnešní doby stále selhávají. Jelikož pokud je epitop alespoň částečně konzervovaný, bývá zároveň málo antigenní. Z tohoto důvodu se u borreliell objevil naprosto jiný přístup k vakcínám. Všechny 3 nové vakcíny zaměřené na OspA využívají strukturní epitopy. Z těchto vakcín byla podrobena komplexnímu testování, a dokonce se nachází v druhé fázi klinických testů, pouze VLA15, tvořená 6 C-terminálními doménami 6 různých OspA sérotypů spojených do 3 proteinů linkery. Oproti všem třem OspA vakcínám stojí potenciální OspC vakcína, která se skládá z jednoho chimeritopního proteinu, který obsahuje stejné variabilní lineární epitopy z různých OspC variant. Všechny tyto vakcíny ukazují značný potenciál a mohly by dokonce změnit dnešní pohled na tvorbu vakcín.

Avšak i přesto, že konzervované epitopy nejspíš nejsou u borreliell tak důležité pro vakcínu ani detekci, jsou stále naprosto nepostradatelné pro pochopení funkce daného proteinu. K určení těchto důležitých funkčních domén je možno využít mnoho volně dostupných programů. Na základě OspC a VlsE jsem porovnal schopnost určování těchto domén u ConSurfu a 3DPatche. Z výsledků jasně vyplývá, že ConSurf je nadřazený v určování konzervovaných motivů, jelikož výsledky z něho lépe odpovídají publikovaným datům o variabilitě OspC a VlsE. Ovšem 3DPatch je zase naprosto nesporně mnohem rychlejší. Z tohoto důvodu je vhodné využívat 3DPatch, pokud máte dostatečné množství sekvencí, které pokrývají celý ORF daného proteinu, a vyžadujete rychlé výsledky. Oproti tomu pokud máte sekvence, které z větší části nepokrývají celý protein, je lepší pro větší přesnost využít ConSurf.

Kromě využití obou programů z analýzy vyplývá, že výpočty založené na evoluční rychlosti jsou nadřazenější entropickým stylům výpočtů při určování konzervovaných AA. Hlavním důvodem tohoto rozdílu nejspíše je, že při výpočtu evoluční rychlosti se berou v potaz i fylogenetické vztahy, které odrážejí skutečný vývoj daného proteinu a umožňují tím pádem přesnější určení konzervovaných AA.

Seznam použité literatury

1. ADEOLU, Mobolaji et al. A phylogenomic and molecular marker based proposal for the division of the genus *Borrelia* into two genera: the emended genus *Borrelia* containing only the members of the relapsing fever *Borrelia*, and the genus *Borreliella* gen. nov. containing the members of the Lyme disease *Borrelia* (*Borrelia burgdorferi* sensu lato complex). *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2014, roč. 105, č. 6. Dostupné z DOI: [10.1007/s10482-014-0164-x](https://doi.org/10.1007/s10482-014-0164-x).
2. AL, Rozewicki et. MAFFT-DASH: integrated protein sequence and structural alignment. *Nucleic acids research*. 2019, roč. 47, č. 1. Dostupné z DOI: [10.1093/nar/gkz342](https://doi.org/10.1093/nar/gkz342).
3. AL, Van den Wijngaard et. Surveillance perspective on Lyme borreliosis across the European Union and European economic area. *Eurosurveillance*. 2017, roč. 22, č. 27. Dostupné z DOI: [10.2807/1560-7917.ES.2017.22.27.30569](https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.27.30569).
4. ANDERSSON, Martin et al. Multiple-strain infections of *Borrelia afzelii*: a role for within-host interactions in the maintenance of antigenic diversity? *The American Naturalist*. 2013, roč. 181, č. 4. Dostupné z DOI: [10.1086/669905](https://doi.org/10.1086/669905).
5. ARNABOLDI, Paul M. et al. Outer surface protein C peptide derived from *Borrelia burgdorferi* sensu stricto as a target for serodiagnosis of early Lyme disease. *Clin. Vaccine Immunol.* 2013, roč. 20, č. 4. Dostupné z DOI: [10.1128/CVI.00608-12](https://doi.org/10.1128/CVI.00608-12).
6. ARNABOLDI, Paul M. et al. Decorin binding proteins A and B in the serodiagnosis of Lyme disease in North America. *Clin. Vaccine Immunol.* 2014, roč. 21, č. 10. Dostupné z DOI: [10.1128/CVI.00383-14](https://doi.org/10.1128/CVI.00383-14).
7. ARREDONDO-ALONSO, Sergio et al. On the (im) possibility of reconstructing plasmids from whole-genome short-read sequencing data. *Microbial genomics*. 2017, roč. 3, č. 10. Dostupné z DOI: [10.1099/mgen.0.000128](https://doi.org/10.1099/mgen.0.000128).
8. *ASHKENAZY, Haim et al. ConSurf 2016: an improved methodology to estimate and visualize evolutionary conservation in macromolecules. *Nucleic acids research*. 2016, roč. 44, č. 1. Dostupné z DOI: [10.1093/nar/gkw408](https://doi.org/10.1093/nar/gkw408).
9. ÅSTRAND, Mia et al. Predicting the ligand-binding properties of *Borrelia burgdorferi* ss Bmp proteins in light of the conserved features of related *Borrelia* proteins. *Journal of Theoretical Biology*. 2019, roč. 462. Dostupné z DOI: [10.1016/j.jtbi.2018.11.004](https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2018.11.004).
10. BARBOUR, Alan G. et al. Evolution and distribution of the ospC gene, a transferable serotype determinant of *Borrelia burgdorferi*. *MBio*. 2010, roč. 1, č. 4. Dostupné z DOI: [10.1128/mBio.00153-10](https://doi.org/10.1128/mBio.00153-10).
11. *BARBOUR, Alan G. et al. Discovery of the Lyme Disease Agent. *mBio*. 2019, roč. 10, č. 5. Dostupné z DOI: [10.1128/mBio.02166-19](https://doi.org/10.1128/mBio.02166-19).
12. *Basic Local Alignment Search Tool* [online]. Dostupné také z: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> [cit. 2020-30-04].
13. BATOOL, Maliha et al. Identification of Surface Epitopes Associated with Protection against Highly Immune-Evasive VlsE-Expressing Lyme Disease Spirochetes. *Infection and Immunity*. 2018, roč. 86, č. 8. Dostupné z DOI: [10.1128/IAI.00182-18](https://doi.org/10.1128/IAI.00182-18).
14. BAUM, Elisabeth et al. Inferring epitopes of a polymorphic antigen amidst broadly cross-reactive antibodies using protein microarrays: a study of OspC proteins of *Borrelia burgdorferi*. *PloS one*. 2013, roč. 8, č. 6. Dostupné z DOI: [10.1371/journal.pone.0067445](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067445).
15. BECKER, Michael et al. Structural investigation of *Borrelia burgdorferi* OspB, a bactericidal Fab target. *Journal of Biological Chemistry*. 2005, roč. 280, č. 17. Dostupné z DOI: [10.1074/jbc.M412842200](https://doi.org/10.1074/jbc.M412842200).
16. BENOIT, Vivian M. et al. Allelic variation of the Lyme disease spirochete adhesin DbpA influences spirochetal binding to decorin, dermatan sulfate, and mammalian cells. *Infection and immunity*. 2011, roč. 79, č. 9. Dostupné z DOI: [10.1128/IAI.00163-11](https://doi.org/10.1128/IAI.00163-11).
17. BHATTACHARJEE, Arnab et al. Structural basis for complement evasion by Lyme disease pathogen *Borrelia burgdorferi*. *Journal of Biological Chemistry*. 2013, roč. 288, č. 26. Dostupné z DOI: [10.1074/jbc.M113.459040](https://doi.org/10.1074/jbc.M113.459040).
18. BIERWAGEN, Paulina et al. *Borrelia* outer surface protein C is capable of human fibrinogen binding. *The FEBS journal*. 2019, roč. 286, č. 12. Dostupné z DOI: [10.1111/febs.14810](https://doi.org/10.1111/febs.14810).
19. BIGELMAYR, Simon et al. Inter- and intraspecies-specific adhesion of Lyme borreliæ to human keratinocytes. *Ticks and Tick-borne Diseases*. 2019, roč. 10, č. 1. Dostupné z DOI: [10.1016/j.ttbdis.2018.10.006](https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.10.006).
20. BIŠKUP, Urška Glinšek et al. Loss of plasmids of *Borrelia burgdorferi* sensu lato during prolonged in vitro cultivation. *Plasmid*. 2011, roč. 66, č. 1. Dostupné z DOI: [10.1016/j.plasmid.2011.02.006](https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2011.02.006).
21. BRANGULIS, Kalvis et al. Crystal structures of the Erp protein family members ErpP and ErpC from *Borrelia burgdorferi* reveal the reason for different affinities for complement regulator factor H. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*. 2015, roč. 1854, č. 5. Dostupné z DOI: [10.1016/j.bbapap.2014.12.025](https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2014.12.025).
22. *BRISSON, Dustin. Negative frequency-dependent selection is frequently confounding. *Frontiers in Ecology and Evolution*. 2018, roč. 6. Dostupné z DOI: [10.3389/fevo.2018.00010](https://doi.org/10.3389/fevo.2018.00010).
23. BRISSON, Dustin et al. Biodiversity of *Borrelia burgdorferi* strains in tissues of Lyme disease patients. *PLoS One*. 2011, roč. 6, č. 8. Dostupné z DOI: [10.1371/journal.pone.0022926](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022926).
24. BYKOWSKI, Tomasz et al. Coordinated expression of *Borrelia burgdorferi* complement regulator-acquiring surface proteins during the Lyme disease spirochete's mammal-tick infection cycle. *Infection and immunity*. 2007, roč. 75, č. 9. Dostupné z DOI: [10.1128/IAI.00604-07](https://doi.org/10.1128/IAI.00604-07).
25. CAINE, Jennifer A. et al. *Borrelia burgdorferi* outer surface protein C (Osp C) binds complement component C 4b and confers bloodstream survival. *Cellular microbiology*. 2017, roč. 19, č. 12. Dostupné z DOI: [10.1111/cmi.12786](https://doi.org/10.1111/cmi.12786).

26. CARRASCO, Sebastian E. et al. Outer surface protein OspC is an antiphagocytic factor that protects *Borrelia burgdorferi* from phagocytosis by macrophages. *Infection and immunity*. 2015, roč. 83, č. 12. Dostupné z DOI: [10.1128/IAI.01215-15](https://doi.org/10.1128/IAI.01215-15).
27. CASJENS, Sherwood R. et al. Plasmid diversity and phylogenetic consistency in the Lyme disease agent *Borrelia burgdorferi*. *BMC genomics*. 2017, roč. 18, č. 1. Dostupné z DOI: [10.1186/s12864-017-3553-5](https://doi.org/10.1186/s12864-017-3553-5).
28. CASJENS, Sherwood R. et al. Primordial origin and diversification of plasmids in Lyme disease agent bacteria. *BMC genomics*. 2018, roč. 19, č. 1. Dostupné z DOI: [10.1186/s12864-018-4597-x](https://doi.org/10.1186/s12864-018-4597-x).
29. Centre for Disease Prevention and Control [online]. Dostupné také z: https://www.cdc.gov/lyme/datasurveillance/index.html?CDC_AA_refVal=https%3A%2F%2Fwww.cdc.gov%2Flyme%2Fstats%2Findex.html [cit. 2020-29-03].
30. CHEN, Shiyong et al. Determination of *Borrelia* surface lipoprotein anchor topology by surface proteolysis. *Journal of Bacteriology*. 2011, roč. 193, č. 22. Dostupné z DOI: [10.1128/JB.05849-11](https://doi.org/10.1128/JB.05849-11).
31. CHEN, Shiyong et al. Probing the *Borrelia burgdorferi* surface lipoprotein secretion pathway using a conditionally folding protein domain. *Journal of Bacteriology*. 2011, roč. 193, č. 23. Dostupné z DOI: [10.1128/JB.06042-11](https://doi.org/10.1128/JB.06042-11).
32. COMSTEDT, Pär et al. Design and development of a novel vaccine for protection against Lyme borreliosis. *PLoS one*. 2014, roč. 9, č. 11. Dostupné z DOI: [10.1371/journal.pone.0113294](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113294).
33. COMSTEDT, Pär et al. The novel Lyme borreliosis vaccine VLA15 shows broad protection against *Borrelia* species expressing six different OspA serotypes. *PLoS one*. 2017, roč. 12, č. 9. Dostupné z DOI: [10.1371/journal.pone.0184357](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184357).
34. CROWLEY, Jameson T. et al. Lipid exchange between *Borrelia burgdorferi* and host cells. *PLoS pathogens*. 2013, roč. 9, č. 1. Dostupné z DOI: [10.1371/journal.ppat.1003109](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003109).
35. CUELLAR, Julia et al. Structural and biomolecular analyses of *Borrelia burgdorferi* BmpD reveal a substrate-binding protein of an ABC-type nucleoside transporter family. *Infection and Immunity*. 2020, roč. 88, č. 4. Dostupné z DOI: [10.1128/IAI.00962-19](https://doi.org/10.1128/IAI.00962-19).
36. DING, Wei et al. Structural identification of a key protective B-cell epitope in Lyme disease antigen OspA. *Journal of molecular biology*. 2000, roč. 302, č. 5. Dostupné z DOI: [10.1006/jmbi.2000.4119](https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4119).
37. DOBRIKOVA, Elena Yu et al. Two independent transcriptional units control the complex and simultaneous expression of the *bmp* paralogous chromosomal gene family in *Borrelia burgdorferi*. *Molecular microbiology*. 2001, roč. 39, č. 2. Dostupné z DOI: [10.1046/j.1365-2958.2001.02220.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02220.x).
38. DOBSON, Christopher M. Biophysical Techniques in Structural Biology. *Annual review of biochemistry*. 2019, roč. 88. Dostupné z DOI: [10.1146/annurev-biochem-013118-111947](https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-013118-111947).
39. DOWDELL, Alexander S. et al. Comprehensive spatial analysis of the *Borrelia burgdorferi* lipoproteome reveals a compartmentalization bias toward the bacterial surface. *Journal of bacteriology*. 2017, roč. 199, č. 6. Dostupné z DOI: [10.1128/JB.00658-16](https://doi.org/10.1128/JB.00658-16).
40. DRESSER, Ashley R. et al. Investigation of the genes involved in antigenic switching at the *vlsE* locus in *Borrelia burgdorferi*: an essential role for the RuvAB branch migrase. *PLoS pathogens*. 2009, roč. 5, č. 12. Dostupné z DOI: [10.1371/journal.ppat.1000680](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000680).
41. EARNHART, Christopher G. et al. Identification of residues within ligand-binding domain 1 (LBD1) of the *Borrelia burgdorferi* OspC protein required for function in the mammalian environment. *Molecular microbiology*. 2010, roč. 76, č. 2. Dostupné z DOI: [10.1111/j.1365-2958.2010.07103.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07103.x).
42. EICKEN, Christoph et al. Crystal structure of Lyme disease variable surface antigen VlsE of *Borrelia burgdorferi*. *Journal of Biological Chemistry*. 2002, roč. 277, č. 24. Dostupné z DOI: [10.1074/jbc.M201547200](https://doi.org/10.1074/jbc.M201547200).
43. EL-HAGE, Nazira et al. Simultaneous coexpression of *Borrelia burgdorferi* Erp proteins occurs through a specific, *erp* locus-directed regulatory mechanism. *Journal of bacteriology*. 2002, roč. 184, č. 16. Dostupné z DOI: [10.1128/JB.184.16.4536-4543.2002](https://doi.org/10.1128/JB.184.16.4536-4543.2002).
44. ELSNER, Rebecca A. et al. Suppression of Long-Lived Humoral Immunity Following *Borrelia burgdorferi* Infection. *PLoS pathogens*. 2015, roč. 11, č. 7. Dostupné z DOI: [10.1371/journal.ppat.1004976](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004976).
45. FENG, Wei et al. Structure of decorin binding protein B from *Borrelia burgdorferi* and its interactions with glycosaminoglycans. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*. 2015, roč. 1854, č. 12. Dostupné z DOI: [10.1016/j.bbapap.2015.08.003](https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2015.08.003).
46. FORTUNE, Danielle E. et al. Identification of lysine residues in the *Borrelia burgdorferi* DbpA adhesin required for murine infection. *Infection and immunity*. 2014, roč. 82, č. 8. Dostupné z DOI: [10.1128/IAI.02036-14](https://doi.org/10.1128/IAI.02036-14).
47. GARCIA, Brandon L. et al. *Borrelia burgdorferi* BBK32 inhibits the classical pathway by blocking activation of the C1 complement complex. *PLoS pathogens*. 2016, roč. 12, č. 1. Dostupné z DOI: [10.1371/journal.ppat.1005404](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005404).
48. GENNÉ, Dolores et al. Competition between strains of *Borrelia afzelii* inside the rodent host and the tick vector. *Proceedings of the Royal Society B*. 2018, roč. 285, č. 1890. Dostupné z DOI: [10.1098/rspb.2018.1804](https://doi.org/10.1098/rspb.2018.1804).
49. *GOMES-SOLECKI, Maria et al. Protective Immunity and New Vaccines for Lyme Disease. *Clinical Infectious Diseases*. 2019. Dostupné z DOI: [10.1093/cid/ciz872](https://doi.org/10.1093/cid/ciz872).
50. GÓMEZ-DÍAZ, Elena et al. Genetic structure of marine *Borrelia garinii* and population admixture with the terrestrial cycle of Lyme borreliosis. *Environmental microbiology*. 2011, roč. 13, č. 9. Dostupné z DOI: [10.1111/j.1462-2920.2011.02515.x](https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02515.x).
51. GUPTA, Radhey S. Distinction between *Borrelia* and *Borrelia* is more robustly supported by molecular and phenotypic characteristics than all other neighbouring prokaryotic genera: Response to Margos' et al. "The genus *Borrelia* reloaded" (PLoS ONE 13 (12): e0208432). *PLoS one*. 2019, roč. 14, č. 8. Dostupné z DOI: [10.1371/journal.pone.0221397](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221397).

52. HALLSTRÖM, Teresia et al. Complement Regulator—Acquiring Surface Protein 1 of *Borrelia burgdorferi* Binds to Human Bone Morphogenetic Protein 2, Several Extracellular Matrix Proteins, and Plasminogen. *The Journal of infectious diseases*. 2010, roč. 202, č. 3. Dostupné z DOI: [10.1086/653825](https://doi.org/10.1086/653825).
53. HAMMERSCHMIDT, Claudia et al. Contribution of the infection-associated complement regulator-acquiring surface protein 4 (ErpC) to complement resistance of *Borrelia burgdorferi*. *Clinical and Developmental Immunology*. 2012, roč. 2012. Dostupné z DOI: <https://doi.org/10.1155/2012/349657>.
54. HARRIS, Gemma. *Borrelia burgdorferi* protein BBK32 binds to soluble fibronectin via the N-terminal 70-kDa region, causing fibronectin to undergo conformational extension. *Journal of Biological Chemistry*. 2014, roč. 289, č. 32. Dostupné z DOI: [10.1074/jbc.M114.578419](https://doi.org/10.1074/jbc.M114.578419).
55. HAVEN, James et al. Pervasive recombination and sympatric genome diversification driven by frequency-dependent selection in *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease bacterium. *Genetics*. 2011, roč. 189, č. 3. Dostupné z DOI: [10.1534/genetics.111.130773](https://doi.org/10.1534/genetics.111.130773).
56. HINCKLEY, Alison F. et al. Lyme disease testing by large commercial laboratories in the United States. *Clinical Infectious Diseases*. 2014, roč. 59, č. 5. Dostupné z DOI: [10.1093/cid/ciu397](https://doi.org/10.1093/cid/ciu397).
57. HMMER [online]. Dostupné také z: <http://hmmer.org/> [cit. 2020-30-04].
58. HYDE, Jenny A. et al. Bioluminescent imaging of *Borrelia burgdorferi* in vivo demonstrates that the fibronectin-binding protein BBK32 is required for optimal infectivity. *Molecular microbiology*. 2011, roč. 82, č. 1. Dostupné z DOI: [10.1111/j.1365-2958.2011.07801.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07801.x).
59. IZAC, Jerilyn R. et al. Identification of a defined linear epitope in the OspA protein of the Lyme disease spirochetes that elicits bactericidal antibody responses: implications for vaccine development. *Vaccine*. 2017, roč. 35, č. 24. Dostupné z DOI: [10.1016/j.vaccine.2017.04.079](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.04.079).
60. IZAC, Jerilyn R. et al. Analysis of the antigenic determinants of the OspC protein of the Lyme disease spirochetes: Evidence that the C10 motif is not immunodominant or required to elicit bactericidal antibody responses. *Vaccine*. 2019, roč. 37, č. 17. Dostupné z DOI: [10.1016/j.vaccine.2019.02.007](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.02.007).
61. IZAC, Jerilyn R. et al. Development and optimization of OspC chimeritope vaccinogens for Lyme disease. *Vaccine*. 2020, roč. 38, č. 8. Dostupné z DOI: [10.1016/j.vaccine.2020.01.027](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.01.027).
62. *JAKUBEC, David et al. 3DPatch: fast 3D structure visualization with residue conservation. *Bioinformatics*. 2018, roč. 35, č. 2. Dostupné z DOI: [10.1093/bioinformatics/bty464](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty464).
63. KAMP, Heather D. et al. Design of a broadly reactive Lyme disease vaccine. *npj Vaccines*. 2020, roč. 5, č. 1. Dostupné z DOI: [10.1038/s41541-020-0183-8](https://doi.org/10.1038/s41541-020-0183-8).
64. *KENEDY, Melisha R. et al. The role of *Borrelia burgdorferi* outer surface proteins. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 2012, roč. 66, č. 1. Dostupné z DOI: [10.1111/j.1574-695X.2012.00980.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2012.00980.x).
65. KIM, Jung Hwa et al. BBK32, a fibronectin binding MSCRAMM from *Borrelia burgdorferi*, contains a disordered region that undergoes a conformational change on ligand binding. *Journal of Biological Chemistry*. 2004, roč. 279, č. 40. Dostupné z DOI: [10.1074/jbc.M401691200](https://doi.org/10.1074/jbc.M401691200).
66. KITAHARA, Ryo et al. A delicate interplay of structure, dynamics, and thermodynamics for function: a high pressure NMR study of outer surface protein A. *Biophysical journal*. 2012, roč. 102, č. 4. Dostupné z DOI: [10.1016/j.bpj.2011.12.010](https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.12.010).
67. KOŁODZIEJCZYK, Robert et al. Crystal structure of a tripartite complex between C3dg, C-terminal domains of factor H and OspE of *Borrelia burgdorferi*. *PloS one*. 2017, roč. 12, č. 11. Dostupné z DOI: [10.1371/journal.pone.0188127](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188127).
68. *KOONIN, Eugene V. The meaning of biological information. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*. 2016, roč. 374, č. 2063. Dostupné z DOI: [10.1098/rsta.2015.0065](https://doi.org/10.1098/rsta.2015.0065).
69. KUMRU, Ozan S. et al. Surface localization determinants of *Borrelia* OspC/Vsp family lipoproteins. *Journal of bacteriology*. 2011, roč. 193, č. 11. Dostupné z DOI: [10.1128/JB.00015-11](https://doi.org/10.1128/JB.00015-11).
70. *LEBRUN, I. et al. Bacterial toxins: an overview on bacterial proteases and their action as virulence factors. *Mini reviews in medicinal chemistry*. 2009, roč. 9, č. 7. Dostupné z DOI: [10.2174/138955709788452603](https://doi.org/10.2174/138955709788452603).
71. LIN, Yi-Pin et al. Strain-specific variation of the decorin-binding adhesin DbpA influences the tissue tropism of the Lyme disease spirochete. *PLoS pathogens*. 2014, roč. 10, č. 7. Dostupné z DOI: [10.1371/journal.ppat.1004238](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004238).
72. LIN, Yi-Pin et al. Glycosaminoglycan binding by *Borrelia burgdorferi* adhesin BBK 32 specifically and uniquely promotes joint colonization. *Cellular microbiology*. 2015, roč. 17, č. 6. Dostupné z DOI: [10.1111/cmi.12407](https://doi.org/10.1111/cmi.12407).
73. LIVERIS, Dionysios et al. *Borrelia burgdorferi* vlsE antigenic variation is not mediated by RecA. *Infection and immunity*. 2008, roč. 76, č. 9. Dostupné z DOI: [10.1128/IAI.00027-08](https://doi.org/10.1128/IAI.00027-08).
74. *LOCKE, Jonathan W. Complement Evasion in *Borrelia* spirochetes: Mechanisms and Opportunities for Intervention. *Antibiotics*. 2019, roč. 8, č. 2. Dostupné z DOI: [10.3390/antibiotics8020080](https://doi.org/10.3390/antibiotics8020080).
75. *LOHR, Benedikt et al. Laboratory diagnosis of Lyme borreliosis: current state of the art and future perspectives. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*. 2018, roč. 55, č. 4. Dostupné z DOI: [10.1080/10408363.2018.1450353](https://doi.org/10.1080/10408363.2018.1450353).
76. LONE, Abdul G. et al. The *Borrelia burgdorferi* VlsE Lipoprotein Prevents Antibody Binding to an Arthritis-Related Surface Antigen. *Cell Reports*. 2020, roč. 30, č. 11. Dostupné z DOI: [10.1016/j.celrep.2020.02.081](https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.02.081).
77. MAKABE, Koki et al. An Overlapping Region between the Two Terminal Folding Units of the Outer Surface Protein A (OspA) Controls Its Folding Behavior. *Journal of molecular biology*. 2018, roč. 430, č. 12. Dostupné z DOI: [10.1016/j.jmb.2018.04.025](https://doi.org/10.1016/j.jmb.2018.04.025).
78. MARGOS, Gabriele et al. Lost in plasmids: next generation sequencing and the complex genome of the tick-borne pathogen *Borrelia burgdorferi*. *BMC genomics*. 2017, roč. 18, č. 1. Dostupné z DOI: [10.1186/s12864-017-3804-5](https://doi.org/10.1186/s12864-017-3804-5).

79. MARGOS, Gabriele et al. The genus *Borrelia* reloaded. *PLoS one*. 2018, roč. 13, č. 12. Dostupné z DOI: [10.1371/journal.pone.0208432](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208432).
80. MARTIN, Myriam et al. Factor H uptake regulates intracellular C3 activation during apoptosis and decreases the inflammatory potential of nucleosomes. *Cell death and differentiation*. 2016, roč. 23, č. 5. Dostupné z DOI: [10.1038/cdd.2015.164](https://doi.org/10.1038/cdd.2015.164).
81. *MEAD, Paul S. Epidemiology of Lyme disease. *Infectious Disease Clinics*. 2015, roč. 29, č. 2. Dostupné z DOI: [10.1016/j.idc.2015.02.010](https://doi.org/10.1016/j.idc.2015.02.010).
82. MECHAI, Samir. Evidence for host-genotype associations of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto. *PLoS One*. 2016, roč. 11, č. 2. Dostupné z DOI: [10.1371/journal.pone.0149345](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149345).
83. MONGODIN, Emmanuel F. et al. Inter-and intra-specific pan-genomes of *Borrelia burgdorferi* sensu lato: genome stability and adaptive radiation. *BMC genomics*. 2013, roč. 14, č. 1. Dostupné z DOI: [10.1186/1471-2164-14-693](https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-693).
84. MORGAN, Ashli M. et al. Structural mechanisms underlying sequence-dependent variations in GAG affinities of decorin binding protein A, a *Borrelia burgdorferi* adhesin. *Biochemical Journal*. 2015, roč. 467, č. 3. Dostupné z DOI: [10.1042/BJ20141201](https://doi.org/10.1042/BJ20141201).
85. NADELMAN, Robert B. et al. Differentiation of reinfection from relapse in recurrent Lyme disease. *New England Journal of Medicine*. 2012, roč. 367, č. 20. Dostupné z DOI: [10.1056/NEJMoa1114362](https://doi.org/10.1056/NEJMoa1114362).
86. NAYAK, Abhijeet et al. A broadly protective multivalent OspA vaccine based on surface shaping of the C-terminal fragment. *Infection and Immunity*. 2020, roč. 88, č. 4. Dostupné z DOI: [10.1128/IAI.00917-19](https://doi.org/10.1128/IAI.00917-19).
87. NEELAKANTA, Girish et al. Outer surface protein B is critical for *Borrelia burgdorferi* adherence and survival within Ixodes ticks. *PLoS pathogens*. 2007, roč. 3, č. 3. Dostupné z DOI: [10.1371/journal.ppat.0030033](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030033).
88. NIDDAM, Alexandra F. et al. Plasma fibronectin stabilizes *Borrelia burgdorferi*-endothelial interactions under vascular shear stress by a catch-bond mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2017, roč. 114, č. 17. Dostupné z DOI: [10.1073/pnas.1615007114](https://doi.org/10.1073/pnas.1615007114).
89. ÖNDER, Özlem et al. OspC is potent plasminogen receptor on surface of *Borrelia burgdorferi*. *Journal of Biological Chemistry*. 2012, roč. 287, č. 20. Dostupné z DOI: [10.1074/jbc.M111.290775](https://doi.org/10.1074/jbc.M111.290775).
90. PAL, Utpal et al. Attachment of *Borrelia burgdorferi* within Ixodes scapularis mediated by outer surface protein A. *The Journal of clinical investigation*. 2000, roč. 106, č. 4. Dostupné z DOI: [10.1172/JCI9427](https://doi.org/10.1172/JCI9427).
91. PAL, Utpal et al. TROSPA, an Ixodes scapularis receptor for *Borrelia burgdorferi*. *Cell*. 2004, roč. 119, č. 4. Dostupné z DOI: [10.1016/j.cell.2004.10.027](https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.10.027).
92. PAL, Utpal et al. *Borrelia burgdorferi* basic membrane proteins A and B participate in the genesis of Lyme arthritis. *The Journal of experimental medicine*. 2007, roč. 205, č. 1. Dostupné z DOI: [10.1084/jem.20070962](https://doi.org/10.1084/jem.20070962).
93. PESESKY, Mitchell et al. Mosaic plasmids are abundant and unevenly distributed across prokaryotic taxa. *Plasmid*. 2019, roč. 102. Dostupné z DOI: [10.1016/j.plasmid.2019.02.003](https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2019.02.003).
94. PRITT, Bobbi S. et al. *Borrelia mayonii* sp. nov., a member of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex, detected in patients and ticks in the upper midwestern United States. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 2016, roč. 66, č. 11. Dostupné z DOI: [10.1099/ijsem.0.001445](https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001445).
95. *R: A Language and Environment for Statistical Computing* [online]. Dostupné také z: <https://www.R-project.org/> [cit. 2020-30-04].
96. RÅBERG, L. et al. Evolution of antigenic diversity in the tick-transmitted bacterium *Borrelia afzelii*: a role for host specialization? *Journal of evolutionary biology*. 2017, roč. 30, č. 5. Dostupné z DOI: [10.1111/jeb.13075](https://doi.org/10.1111/jeb.13075).
97. ROGOVSKYY, Artem S. et al. Evaluation of the importance of VlsE antigenic variation for the enzootic cycle of *Borrelia burgdorferi*. *PLoS One*. 2015, roč. 10, č. 4. Dostupné z DOI: [10.1371/journal.pone.0124268](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124268).
98. ROGOVSKYY, Artem S. et al. Antibody response to Lyme disease spirochetes in the context of VlsE-mediated immune evasion. *Infection and immunity*. 2017, roč. 85, č. 1. Dostupné z DOI: [10.1128/IAI.00890-16](https://doi.org/10.1128/IAI.00890-16).
99. RYNKIEWICZ, Evelyn C. Closely-related *Borrelia burgdorferi* (sensu stricto) strains exhibit similar fitness in single infections and asymmetric competition in multiple infections. *Parasites & vectors*. 2017, roč. 10, č. 1. Dostupné z DOI: [10.1186/s13071-016-1964-9](https://doi.org/10.1186/s13071-016-1964-9).
100. SALO, Jemiina et al. Decorin binding by DbpA and B of *Borrelia garinii*, *Borrelia afzelii*, and *Borrelia burgdorferi* sensu Stricto. *Journal of Infectious Diseases*. 2011, roč. 204, č. 1. Dostupné z DOI: [10.1093/infdis/jir207](https://doi.org/10.1093/infdis/jir207).
101. SANCHEZ, Edgar et al. Diagnosis, treatment, and prevention of Lyme disease, human granulocytic anaplasmosis, and babesiosis: a review. *Jama*. 2016, roč. 315, č. 16. Dostupné z DOI: [10.1001/jama.2016.2884](https://doi.org/10.1001/jama.2016.2884).
102. SCHWAB, Jasmin et al. *Borrelia valaisiana* resist complement-mediated killing independently of the recruitment of immune regulators and inactivation of complement components. *PLoS One*. 2013, roč. 8, č. 1. Dostupné z DOI: [10.1371/journal.pone.0053659](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053659).
103. *STANEK, Gerold et al. Lyme borreliosis-from tick bite to diagnosis and treatment. *FEMS microbiology reviews*. 2018, roč. 42, č. 3. Dostupné z DOI: [10.1093/femsre/fux047](https://doi.org/10.1093/femsre/fux047).
104. STATES, S. L. et al. Lyme disease risk not amplified in a species-poor vertebrate community: similar *Borrelia burgdorferi* tick infection prevalence and OspC genotype frequencies. *Infection, Genetics and Evolution*. 2014, roč. 27. Dostupné z DOI: [10.1016/j.meegid.2014.04.014](https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.04.014).
105. *STEERE, Allen C. et al. Lyme borreliosis. *Nature reviews Disease primers*. 2016, roč. 2. Dostupné z DOI: [10.1038/nrdp.2016.90](https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.90).
106. *STONE, Brandee L. et al. Brave new worlds: the expanding universe of Lyme disease. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. 2017, roč. 17, č. 9. Dostupné z DOI: [10.1089/vbz.2017.2127](https://doi.org/10.1089/vbz.2017.2127).

107. STÜBS, Gunthard et al. Acylated cholesteryl galactosides are ubiquitous glycolipid antigens among *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 2011, roč. 63, č. 1. Dostupné z DOI: [10.1111/j.1574-695X.2011.00827.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2011.00827.x).
108. TILLY, Kit et al. Requirements for *Borrelia burgdorferi* plasmid maintenance. *Plasmid*. 2012, roč. 68, č. 1. Dostupné z DOI: [10.1016/j.plasmid.2012.01.009](https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2012.01.009).
109. TILLY, Kit et al. Functional equivalence of OspA and OspB, but not OspC, in tick colonization by *Borrelia burgdorferi*. *Infection and immunity*. 2016, roč. 84, č. 5. Dostupné z DOI: [10.1128/IAI.00063-16](https://doi.org/10.1128/IAI.00063-16).
110. TOLEDO, Alvaro et al. Lipid rafts can form in the inner and outer membranes of *Borrelia burgdorferi* and have different properties and associated proteins. *Molecular microbiology*. 2018, roč. 108, č. 1. Dostupné z DOI: [10.1111/mmi.13914](https://doi.org/10.1111/mmi.13914).
111. TOUMANIOS, Christina et al. Linear B Cell Epitopes Derived from the Multifunctional Surface Lipoprotein BBK32 as Targets for the Serodiagnosis of Lyme Disease. *mSphere*. 2019, roč. 4, č. 3. Dostupné z DOI: [10.1128/mSphere.00111-19](https://doi.org/10.1128/mSphere.00111-19).
112. TRAVINSKY, Bridgit et al. Geographic differences in genetic locus linkages for *Borrelia burgdorferi*. *Emerging infectious diseases*. 2010, roč. 16, č. 7. Dostupné z DOI: [10.3201/eid1607.091452](https://doi.org/10.3201/eid1607.091452).
113. *TUFTS, Danielle M. et al. Outer surface protein polymorphisms linked to host-spirochete association in Lyme borreliosis. *Molecular microbiology*. 2019, roč. 111, č. 4. Dostupné z DOI: [10.1111/mmi.14209](https://doi.org/10.1111/mmi.14209).
114. VERHEY, Theodore B. et al. Analysis of recombinational switching at the antigenic variation locus of the Lyme spirochete using a novel PacBio sequencing pipeline. *Molecular microbiology*. 2018, roč. 107, č. 1. Dostupné z DOI: [10.1111/mmi.13873](https://doi.org/10.1111/mmi.13873).
115. VERHEY, Theodore B. et al. Antigenic variation in the Lyme spirochete: detailed functional assessment of recombinational switching at vlsE in the JD1 strain of *Borrelia burgdorferi*. *Molecular microbiology*. 2019, roč. 111, č. 3. Dostupné z DOI: [10.1111/mmi.14189](https://doi.org/10.1111/mmi.14189).
116. VERHEY, Theodore et al. Antigenic variation in the Lyme spirochete: insights into recombinational switching with a suggested role for error-prone repair. *Cell reports*. 2018, roč. 23, č. 9. Dostupné z DOI: [10.1016/j.celrep.2018.04.117](https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.04.117).
117. VERMA, Ashutosh et al. *Borrelia burgdorferi* BmpA is a laminin-binding protein. *Infection and immunity*. 2009, roč. 77, č. 11. Dostupné z DOI: [10.1128/IAI.01420-08](https://doi.org/10.1128/IAI.01420-08).
118. WANG, Xu. Solution structure of decorin-binding protein A from *Borrelia burgdorferi*. *Biochemistry*. 2012, roč. 51, č. 42. Dostupné z DOI: [10.1021/bi3007093](https://doi.org/10.1021/bi3007093).
119. WEBER, Laura K. et al. Antibody fingerprints in lyme disease deciphered with high density peptide arrays. *Engineering in Life Sciences*. 2017, roč. 17, č. 10. Dostupné z DOI: [10.1002/elsc.201700062](https://doi.org/10.1002/elsc.201700062).
120. WEENING, Eric H. et al. *Borrelia burgdorferi* lacking DbpBA exhibits an early survival defect during experimental infection. *Infection and immunity*. 2008, roč. 76, č. 12. Dostupné z DOI: [10.1128/IAI.00690-08](https://doi.org/10.1128/IAI.00690-08).
121. WOODMAN, Michael E. et al. *Borrelia burgdorferi* binding of host complement regulator factor H is not required for efficient mammalian infection. *Infection and immunity*. 2007, roč. 75, č. 6. Dostupné z DOI: [10.1128/IAI.01923-06](https://doi.org/10.1128/IAI.01923-06).
122. XIE, Jialei et al. Structural determination of the complement inhibitory domain of *Borrelia burgdorferi* BBK32 provides insight into classical pathway complement evasion by lyme disease spirochetes. *PLoS pathogens*. 2019, roč. 15, č. 3. Dostupné z DOI: [10.1371/journal.ppat.1007659](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007659).
123. *ZÜCKERT, Wolfram R. Protein Secretion in Spirochetes. *Microbiology spectrum*. 2019, roč. 7, č. 3. Dostupné z DOI: [10.1128/microbiolspec.PSIB-0026-2019](https://doi.org/10.1128/microbiolspec.PSIB-0026-2019).

Přílohy

R kód #1

```
#### Příprava knihovny
install.packages("BiocManager")
BiocManager::install("Biostrings")
install.packages("seqinr")
install.packages("stringr")
install.packages("phylotools")
install.packages("tidyverse")

#### Načtení knihovny
library(Biostrings)
library(seqinr)
library(stringr)
library(phylotools)
library(tidyverse)

#### Kód pro překlad OspC i VlsE
## načtení fasty (napište jméno fasty do ""po file =)
translatable <- seqinr::read.fasta(file = "",
                                   seqtype = "DNA",
                                   forceDNAtolower = FALSE) %>%

  supply(str_c)

output <- length(translatable)
for (i in seq_along(translatable)) {
  output[i] <- word(names(translatable[i]), 1, sep = "\\:")
}

names(translatable) = NULL
names(translatable) = output

translatable <- translatable[unique(names(translatable))] ## extrahování nejlepšího hitu z BLASTu

output <- vector("list", length(translatable))
names(output) <- names(translatable)
for (i in seq_along(translatable)) {
  output[[i]] <- paste(translatable[[i]], collapse = "")
}

translatable <- supply(output, DNASTringSet)

## překlad
BGC <- getGeneticCode("11") ## získání bakteriálního genetického kódu

translatable_frames <- lapply(1:3,
                              function(pos)
                                lapply(translatable,
                                       subseq,
                                       start = pos)) ## vytváření různých čtecích rámců

translated <- c(list(vector("list", length(translatable))),
               list(vector("list", length(translatable))),
               list(vector("list", length(translatable))))
```

```

for (i in 1:3) {
  names(translated[[i]]) <- names(translatable)
}

for (i in 1:3) {
  for (y in seq_along(translatable)) {
    translated[[c(i, y)]] <- Biostrings::translate(translatable_frames[[c(i, y)]],
                                                    BGC,
                                                    if.fuzzy.codon = "solve")
  }
} ## překlad (může zabrat pár minut)

maximum <- max(unlist(lapply(translated[[1]], str_length))) ## odstranění špatných čtecích rámců

for (i in 1:3) {
  for (y in seq_along(translatable)) {
    if (1 < vcountPattern("*", translated[[c(i, y)]])) {
      translated[[c(i, y)]] <- DNASTringSet("TTT")
    } else if (1 <= vcountPattern("X", translated[[c(i, y)]])) {
      translated[[c(i, y)]] <- DNASTringSet("TTT")
    }
  }
}

translated <- unlist(translated)
translated <- translated[lapply(translated, str_length) > 3] %>%
  lapply(as.character)

for (i in seq_along(translated)) {
  translated[[i]] <- str_remove(translated[[i]], "[*]")
} ## odstranění stop kodonů na konci sekvencí

### POZOR ### nutno měnit tuto část kódu podle poznámek
fseq <- seqinr::read.fasta(file = "", seqtype = "AA") %>%
  sapply(str_c) %>%
  paste(collapse = "") %>%
  list() ## načtení 1ggq/1l8w sekvence pro alignment (pro ospc/vlse napište do "" po file = jméno fasty obsahující
1ggq/1l8w sekvenci)

names(fseq) = names(seqinr::read.fasta(file = "", seqtype = "AA")) ## pojmenování 1ggq/1l8w sek-
vence (po file = do "" napište jméno fasty obsahující 1ggq/1l8w sekvenci)

translated <- translated[unique(names(translated))]

translated <- c(fseq, translated)

write.fasta(translated,
            file.out = "",
            names = names(translated),
            nbchar = 60,
            as.string = TRUE) ## výstupní přeložená fasta (po file.out do "" napište jméno své výstupní fasty)

```

R kód #2

```
#### Příprava knihovny
install.packages("rjson")
install.packages("ggplot2")
install.packages("dplyr")
install.packages("VennDiagram")
install.packages("RColorBrewer")

#### Načítání knihovny
library("rjson")
library("ggplot2")
library("dplyr")
library("VennDiagram")
library("RColorBrewer")
library("stringr")

#### Čtení JSON souboru a textového souboru
patch <- fromJSON(file = "") ## po file = do "" napište jméno JSON souboru
consurf_grades <- read.delim(file = "", skip = 13, sep = "") ## po file = do "" napište jméno textového souboru

#### Extrahování skóre z JSON souboru
bit_score <- patch$height_arr

for (i in seq_along(bit_score)) {
  bit_score[[i]] <- strsplit(bit_score[[i]], split = ":")
}

patch_score <- data.frame(matrix(unlist(bit_score),
                                ncol = length(bit_score),
                                nrow = 2*length(bit_score[[1]]),
                                stringsAsFactors=FALSE))

patch_score <- patch_score[!c(TRUE,FALSE), ]
names(patch_score) = length(bit_score)

for (i in seq_along(patch_score)) {
  patch_score[[i]] <- as.numeric(patch_score[[i]])
}

vlse <- c(83:123, 166:169, 175:192, 194, 195, 197:201, 205, 208, 209, 211:214, 216, 217,
        225, 232, 234, 235, 237, 243:246, 251:253, 259, 262:269, 273:276, 288:292, 294,
        296, 297, 307:309, 311, 313, 316, 318, 319, 322, 324, 327:330, 337:341, 344,
        345, 349, 351, 355,358, 361, 363, 367:369, 371, 374, 375, 377:382, 393:397,
        401:409, 417, 422, 425, 429, 432, 445, 449, 451, 452, 454, 456:469, 472, 478,
        480, 481, 484, 487, 489:491, 493, 500, 502:504, 506, 508, 510:529, 531, 533,
        539, 548, 550, 552:555, 558, 561:596)
ospc <- c(33:111, 113:195)

#### POZOR ### nutno měnit tuto část kódu podle poznámek
patch_score <- data.frame(patch = unlist(lapply(patch_score, sum)))
patch_score <- data.frame(patch = patch_score[, ]) ## pro ospc napište do "" za patch_score[ ospc
a pro vlse napište vlse

ospc <- c(seq(0, 1.12, length.out=8), 1.29, 1.45, 1.61)
vlse <- c(0, 0.35, 0.69, 1.04, 1.39, 1.73, 2.08, 2.42, 2.77, 3.12, 3.5)
```

```

patch_score$patch <- as.numeric(cut(patch_score$patch, ,
                                   labels = 1:10)) ## pro ospc napište za patch_score$patch, ospc a pro
vlse napište vlse

### Extrahování skóre z textového souboru
ospc <- c(4:165)
vlse <- c(45:85, 106:335)
consurf_grades <- consurf_grades[,c(3,5)]
consurf_grades <- data.frame(COLOR = consurf_grades[, 2]) ## za consurf_grades[ napište ospc pro
ospc a pro vlse napište vlse

for (i in seq_along(consurf_grades$COLOR)) {
  consurf_grades[[i,1]] <- str_remove(consurf_grades[[i,1]], "[*]")
} ## odstraní všechny * ze skóre a ponechá hodnoty skóre

consurf_grades <- data.frame("consurf" = (as.numeric(as.character(consurf_grades[,1]))))

### Vytváření skupin pro porovnávání AA podle pozic a skóre
consurf_grades <- cbind(consurf_grades,
                        data.frame(position = c(1:length(consurf_grades$consurf)),
                                   variability = cut(consurf_grades$consurf, c(0,3,6,9),
                                   labels = c("V", "IB", "C"))))

patch_score <- cbind(patch_score,
                     data.frame(position = c(1:length(patch_score$patch)),
                                   variability = cut(patch_score$patch,
                                   c(0, 3, 5, 7, 10),
                                   c("V", "SA", "SK", "C"))))

patch_score <- patch_score[,c(2, 3)]
consurf_grades <- consurf_grades[,c(2, 3)]

consurf_grades <- paste(consurf_grades$variability, consurf_grades$position, sep = "")
patch_score <- paste(patch_score$variability, patch_score$position, sep = "")

patch_V <- grep("V", patch_score)
patch_SV <- grep("SA", patch_score)
patch_SK <- grep("SK", patch_score)
patch_K <- grep("C", patch_score)

consurf_V <- grep("V", consurf_grades)
consurf_M <- grep("IB", consurf_grades)
consurf_K <- grep("C", consurf_grades)

### Vytváření Vennového diagramu
myCol <- brewer.pal(7, "Accent")
myCol_V <- myCol[c(1:5)]
myCol_M <- myCol[c(6, 2:5)]
myCol_K <- myCol[c(7, 2:5)]
venn.diagram(list(consurf_V, patch_V, patch_SV, patch_SK, patch_K),
              category.names = c("ConSurf silně var. AA",
                                "3DPatch silně var. AA",
                                "3DPatch slabě var. AA",
                                "3DPatch slabě kon. AA",
                                "3DPatch silně kon. AA"),
              filename = "AA_porovnani-V.png",
              height = 1000,
              width = 1000,
              resolution = 300,
              compression = "lzw",
              lwd = 2,

```



```

col = myCol_V,
fill = myCol_V,
cat.cex = 0.6,
cat.fontface = "bold",
cat.default.pos = "outer",
cat.pos = c(-5, 10, -175, 5, -10),
cat.dist = c(0.1, 0.2, 0.15, -0.17, 0.2),
cat.fontfamily = "sans") ## porovnávání silně variabilních AA

venn.diagram(list(consurf_M, patch_V, patch_SV, patch_SK, patch_K),
category.names = c("ConSurf slabě var. a kon. AA",
                    "3DPatch silně var. AA",
                    "3DPatch slabě var. AA",
                    "3DPatch slabě kon. AA",
                    "3DPatch silně kon. AA"),
filename = "AA_porovnani_M.png",
height = 1000,
width = 1000,
resolution = 300,
compression = "lzw",
lwd = 2,
col = myCol_M,
fill = myCol_M,
cat.cex = 0.6,
cat.fontface = "bold",
cat.default.pos = "outer",
cat.pos = c(-5, 10, -175, 5, -10),
cat.dist = c(0.1, 0.2, 0.15, -0.17, 0.2),
cat.fontfamily = "sans") ## porovnávání málo variabilních a konzervovaných AA

venn.diagram(list(consurf_K, patch_V, patch_SV, patch_SK, patch_K),
category.names = c("ConSurf silně kon. AA",
                    "3DPatch silně var. AA",
                    "3DPatch slabě var. AA",
                    "3DPatch slabě kon. AA",
                    "3DPatch silně kon. AA"),
filename = "AA_porovnani_K.png",
height = 1000,
width = 1000,
resolution = 300,
compression = "lzw",
lwd = 2,
col = myCol_K,
fill = myCol_K,
cat.cex = 0.6,
cat.fontface = "bold",
cat.default.pos = "outer",
cat.pos = c(-5, 10, -175, 5, -10),
cat.dist = c(0.1, 0.2, 0.15, -0.17, 0.2),
cat.fontfamily = "sans") ## porovnávání silně konzervovaných AA

```